

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE

Dottorato di ricerca in

Biologia e Patologia Molecolare

XXI CICLO (2006 – 2009)

LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE

CON TRASLOCAZIONE t(9;11)(p22;q23)

TUTOR:

Prof. ROBERTO SALA

COORDINATORE:

Prof. GIANCARLO GAZZOLA

Dottorando:

VINCENZO MARTINO

INDICE

1. ABSTRACT.....	5
2. RIASSUNTO	6
3. INTRODUZIONE.....	7
3.1. Leucemie – generalità	7
3.2. Leucemia Mieloide Acuta (LAM): classificazione.....	8
3.3. LAM con alterazioni della banda cromosomica 11q23	11
3.4. Struttura del gene MLL e relativa proteina codificata	15
3.4.1. Motivi strutturali della porzione amino-terminale di MLL (MLL ^N)	15
3.4.2. Motivi strutturali della porzione carbossi-terminale di MLL (MLL ^C)	16
3.5. Espressione e Funzione di MLL	18
3.6. Riarrangiamenti del gene MLL.....	20
3.7. Gene di fusione MLL-AF9 - LAM con traslocazione t(9;11)(p22;q23).....	22
3.8. Geni e proteine target di MLL e proteine di fusione di MLL	23
3.9. Terapia attuale per le LAM con riarrangiamenti 11q23/MLL.....	25
3.10. Nuove strategie terapeutiche per le LAM con 11q23/MLL rearrangements	27
4. SCOPO DELLO STUDIO	31
5. MATERIALI E METODI.....	32
5.1. Colture cellulari e trattamenti sperimentali.....	32
5.2. Analisi cellulare	34
5.2.1. Valutazione dell'aderenza e della morfologia cellulare.....	34
5.2.2. Valutazione della proliferazione e della vitalità cellulare.....	35
5.2.3. Valutazione dell'apoptosi	36
5.2.4. Valutazione del ciclo cellulare	36
5.3. Analisi del differenziamento terminale monocito-macrifagico	37
5.3.1. Valutazione dell'espressione di antigeni di superficie.....	37

5.3.2. Valutazione della funzionalità enzimatica tramite saggio NBT	37
5.3.3. Valutazione della funzione fagocitica.....	39
5.4. Analisi molecolare	40
5.4.1. Estrazione dell'RNA	40
5.4.2. Retrotrascrizione dell'RNA estratto a cDNA	40
5.4.3. PCR semi-quantitativa Real Time.....	41
6. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	43
6.1. Espressione di MLL-AF9 e suoi geni target durante la maturazione monocito-macrofagica in linee cellulari di LAM-M5 con traslocazione t(9;11)(p22;q23).	43
6.1.1. Espressione di <i>MLL-AF9</i> e <i>MYC</i>	43
6.1.2. Espressione dei geni <i>HOXA</i> e <i>MEIS1</i>	46
6.1.3. Espressione di <i>MYB</i> , in cellule THP-1	49
6.2. Analisi sull'induzione del differenziamento terminale monocito-macrofagico in linee cellulari di LAM-M5 con traslocazione t(9;11)(p22;q23).	51
6.2.1. Effetti del PMA a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23)	51
6.2.2. Effetti dell'IFN- γ a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23)	58
6.2.3. Effetti della combinazione PMA + IFN- γ a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23).....	61
6.2.4. L'inibizione della proliferazione cellulare non è sufficiente per ripristinare il differenziamento terminale indotto dall'M-CSF, in cellule THP-1	64
6.2.5. Effetti della decitabina a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23).....	74
6.2.6. Effetti della vitamina D3 a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23) .	79
7. BIBLIOGRAFIA	84

1. ABSTRACT

The translocation t(9;11)(p22;q23) generates the *MLL-AF9* oncogene and is commonly associated with monocytic acute myeloid leukemia (AML-M5; FAB-classification). For the oncogenicity of *MLL-AF9*, the (over)expression of several other genes, including *HOXA4*, 5, 6, 7, 9, 10 and 11 (defined as “*HOXA-code*” genes), *MEIS1* (a cofactor of “*HOXA-code*” proteins) and *MYB* is required. We previously showed that the down-regulation of *MLL-AF9* expression is not obligatory for monocyte-macrophage maturation in AML-M5 cells carrying t(9;11)(p22;q23). In this study, we analyzed the expression patterns of “*HOXA-code*”, *MEIS1* and *MYB* genes, by semiquantitative Real Time PCR means, during the monocyte-macrophage differentiation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), in THP-1 cells carrying t(9;11)(p22;q23) and expressing *MLL-AF9*. The results showed that all the analyzed genes were expressed in untreated THP-1 cells. After the induction of differentiation, we observed a down-regulation of *HOXA4*, 7, 10, 11, *MEIS1* and *MYB*, indicating that the expression of these genes could be implicated in the differentiation blockage observed in leukemias with 11q23/*MLL* abnormalities. Because standard chemotherapy is not curative for many patients with AML *MLL*-related, we also evaluated the effects of several molecules, alone or in combination, at clinically achievable concentrations, on differentiation along monocyte-macrophage lineage, in AML-M5 cell lines carrying t(9;11)(p22;q23) and expressing *MLL-AF9*. The results indicated that strategies combining demethylating agents, such as decitabine, and drugs that induce normal monocytic differentiation, such as Vitamin D3, had strong anti-leukemic activity and warrants further investigation in this type of malignancy.

2. RIASSUNTO

La traslocazione t(9;11)(p22;q23) genera l'oncogene *MLL-AF9* ed è comunemente associata con la leucemia acuta mieloide monocitica (LAM-M5; classificazione FAB). Per l'oncogenicità di *MLL-AF9*, è richiesta l'(over)espressione di diversi altri geni, tra cui *HOXA4*, 5, 6, 7, 9, 10 e 11 (definiti come “*HOXA-code*” genes), *MEIS1* (un cofattore delle proteine “*HOXA-code*”) e *MYB*. Precedentemente, abbiamo riportato che la down-regolazione dell'espressione di *MLL-AF9* non era obbligatoria per la maturazione monocito-macrofagica in cellule di LAM-M5 con traslocazione t(9;11)(p22;q23). In questo studio abbiamo analizzato l'espressione dei geni “*HOXA-code*”, *MEIS1* e *MYB*, mediante PCR semi-quantitativa Real Time, durante il differenziamento monocito-macrofagico indotto dal phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), in cellule THP-1 che possiedono la traslocazione t(9;11)(p22;q23) ed esprimono *MLL-AF9*. I risultati mostravano che tutti i geni analizzati erano espressi nelle cellule THP-1 non trattate. Dopo l'induzione del differenziamento, abbiamo osservato una down-regolazione di *HOXA4*, 7, 10, 11, *MEIS1* e *MYB*, indicando che l'espressione di questi geni potrebbe essere implicata nel blocco del differenziamento osservato in leucemie relative a *MLL-AF9*. Poiché la chemioterapia standard non è curativa per molti pazienti con LAM-M5 con anomalìa 11q23/*MLL*, abbiamo anche valutato gli effetti di diverse molecole, singole ed in combinazione, a concentrazioni clinicamente ottenibili, sul differenziamento lungo il *lineage* monocito-macrofagico, in linee cellulari di LAM-M5 con traslocazioni t(9;11)(p22;q23) e che esprimono *MLL-AF9*. I risultati indicavano che la combinazione di agenti demetilanti, come la decitabina, e molecole che inducono il differenziamento monocitico normale, come la Vitamina D3, aveva una forte attività anti-leucemica e si raccomandano ulteriori investigazioni di tale combinazione in questo tipo di neoplasia.

3. INTRODUZIONE

3.1. Leucemie – generalità

Le leucemie sono malattie neoplastiche dei precursori emopoietici. Tutte le cellule del sistema emopoietico sono continuamente generate da cellule staminali emopoietiche, presenti nel midollo osseo. La trasformazione leucemica può influenzare tutte le linee differenziative emopoietiche e la proliferazione del clone cellulare leucemico interferisce con il normale processo di emopoiesi.

L'eziologia della maggior parte delle leucemie è sconosciuta, anche se ci sono fattori di rischio come una precedente esposizione a radiazioni ionizzanti, ad agenti chemioterapici citotossici e a sostanze quali il benzene. Un'aumentata incidenza di leucemia si registra in diverse malattie congenite, come la sindrome di Down, la sindrome di Bloom, la sindrome di Turner e l'anemia di Fanconi. Pazienti con disordini mieloproliferativi e mielodisplastici presentano elevati rischi di sviluppare una leucemia. Infine, anche il fumo di sigaretta può aumentare l'incidenza della leucemia (DeVita *et al.*, 2004).

Nelle leucemie, il termine "acuta" era riferito in passato al rapido esito fatale di tale patologia; ora, invece, indica la natura relativamente indifferenziata delle cellule leucemiche. Il termine "cronica", che in passato indicava un evolversi molto più lento della leucemia, oggi indica che le cellule leucemiche hanno ancora la possibilità di maturazione terminale. L'organizzazione mondiale della sanità (OMS/ WHO - World Health Organization) ha proposto che la percentuale di blasti, nel midollo osseo, deve essere almeno del 20%, per giustificare una diagnosi di leucemia acuta (la percentuale "normale" di cellule immature/indifferenziate nel midollo osseo è < 5%).

L'incidenza complessiva annuale delle leucemie è, nella popolazione generale, di circa 4 casi per 100.000 persone, con approssimativamente il 70% dei casi che sono di tipo "acuto" e fenotipo "mieloide" (vedi dopo per la classificazione fenotipica delle leucemie). L'incidenza della leucemia è diversa a seconda dell'età, in particolare la frequenza della leucemia è alta nei soggetti pediatrici e nelle persone con oltre 60 anni di età. In generale, nei pazienti adulti-anziani prevalgono le forme croniche e di tipo mieloide, mentre nei pazienti pediatrici prevalgono le forme acute e di tipo linfoide (Stone, 2002). Inoltre, la leucemia acuta è la forma più comune di

neoplasia pediatrica (di cui l'80-85% è di tipo linfoide e il 15-20% di tipo mieloide); in particolare, la leucemia acuta rappresenta circa un terzo di tutte le neoplasie nei bambini e la causa primaria di mortalità pediatrica relativa a neoplasie (Chowdhury and Brady, 2008).

3.2. Leucemia Mieloide Acuta (LAM): classificazione

Le leucemie sono state classificate nel tempo in diversi modi; tuttavia, le due classificazioni che vengono più comunemente utilizzate sono le seguenti:

- FAB (French-American-British) (Bennett *et al.*, 1976; Bennett *et al.*, 1985)
- WHO (World Health Organization) (Harris *et al.*, 1999).

Sia la classificazione FAB che quella WHO prendono in considerazione le caratteristiche morfologiche, citochimiche ed immunofenotipiche delle cellule neoplastiche, per stabilire il *lineage* ed il grado di maturazione delle cellule stesse.

Tuttavia, recentemente, altre caratteristiche hanno mostrato di essere importanti per il comportamento clinico di queste malattie, come particolari proprietà genetiche (citogenetiche e genetico-molecolari) e precedenti terapie o mielodisplasie. Queste ultime caratteristiche non sempre correlano con le categorie della classificazione FAB. Quindi, la classificazione WHO cerca di integrare tutti gli aspetti, clinicamente rilevanti, di una leucemia, per ottenere una migliore classificazione.

Il Gruppo Cooperativo Franco-Americano-Britannico (FAB) ha elaborato il primo schema di classificazione delle leucemie su base morfologica, con implicazioni anche di ordine prognostico. Questa classificazione è stata ampiamente utilizzata dagli ematologi e ha avuto il grande pregio di uniformare la terminologia, rendendo raffrontabili le varie casistiche. Tale classificazione utilizza sia parametri morfologici, come la percentuale di sideroblasti ad anello, che altri parametri, tra cui la percentuale di blasti nel midollo osseo e nel sangue periferico e la presenza di eventuale monocitosi (tabella 1).

Tabella 1. Classificazione FAB della Leucemia Acuta Mieloide (LAM).

Tipo FAB	Nome comune	Criteri per la diagnosi	Isto-chimica	Note
M0	LA indifferenziata			Cellule senza maturazione citologica, con antigeni mieloidi (CD13, 33) e mieloperossidasi negative.
M1	LA mieloblastica senza maturazione	Blasti >90% cellule non-eritroidi, 10% di cellule in maturazione a granulociti o monociti.	MP+	Facilmente confusa con M7 o L2 su base morfologica
M2	LA mieloblastica con maturazione	Blasti 30-89% cell. non-eritroidi, >10% granulociti in maturazione, <20% cellule monocitiche.	MP+	La popolazione cellulare è costituita prevalentemente da blasti e promielociti immaturi
M3	LA Promielocitica (variante ipergranulare)	<20% promielociti ipergranulari anormali. Corpi di Auer presenti.	MP+	Associata a CID (coagulazione intravascolare disseminata).
M3v	LA Promielocitica (variante microgranul.)	Promielociti con piccoli granuli citoplasmatici.	MP+	Vedi sopra.
M4	LA mielo-monocitica	Blasti >30% cellule non-eritroidi, >20 ma <80% di cellule sono del lineage monocitico.	MP+ NSE+	Richiede la valutazione sia del sangue periferico sia del midollo osseo.
M4Eo	LA mielo-monocitica con eosinofilia	Eosinofili anormali con grandi granuli basofili e nucleo monolobato. Positivi alla cloroacetatoesterasi.	MP+ NSE+ Eos-PAS+	Negli eosinofili normali tali reazioni sono negative.
M5	LA monocitica poco (M5a) o ben (M5b) differenziata.	>80% cellule non-eritroidi sono monoblasti, promonociti, o monociti. M5a >80% delle cellule monocitiche sono monoblasti. M5b <80% delle cellule monocitiche sono monoblasti.	NSE+	È necessaria la conferma della diagnosi mediante la reazione esterasica inibita dai fluoruri (NaF).
M6	Eritroleucemia (spesso evolve a M1, M2 o M4)	>30% cellule non-eritroidi sono blasti, ma >50% delle cellule del midollo sono eritroblasti.	Eritroblasti PAS+	Iperplasia eritroide megaloblastoide; eritroblasti bizzarri multinucleati.
M7	LA megacariocitica	>30% cellule non-eritroidi sono megacarioblasti. Mielofibrosi.	piastrine perox +	La diagnosi è confermata dalla reazione perossidasi piastrinica con la microscopia elettronica o con anticorpi monoclonali anti-glicoproteine piastriniche.

Note: MP: mieloperossidasi; NSE: esterasi non specifica; PAS: Periodic acid-Schiff. Corpi di Auer: derivano dalla condensazione anomala di granuli citoplasmatici; la loro presenza nelle cellule immature consente di distinguere la LAM dalle Leucemie Acute Linfoidi (LAL), mentre la loro assenza non ha valore diagnostico.

Più di recente, è stata proposta una nuova classificazione delle malattie neoplastiche del tessuto emopoietico e linfoide: la classificazione WHO (Harris *et al.*, 1999). In tale classificazione le neoplasie ematologiche vengono suddivise, prima di tutto, secondo il loro *lineage*: neoplasie mieloidi, neoplasie linfoidei, malattie dei mastociti e neoplasie degli istiociti; alcune varianti o sub-tipi delle neoplasie principali sono ulteriormente classificate (Harris *et al.*, 1999). In ciascuna categoria, le diverse malattie sono definite secondo una combinazione di morfologia, immunofenotipo, caratteristiche genetiche e sindromi cliniche. La relativa importanza di ciascun criterio differisce tra le varie neoplasie e non c'è nessuna classificazione standard valida per tutte le neoplasie ematologiche.

Per quanto riguarda le leucemie acute mieloidi, nella classificazione WHO esse sono suddivise in 4 categorie (tabella 2).

Tabella 2. Classificazione WHO delle leucemie acute mieloidi (Harris et al., 1999)

Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities

- AML with t(8;21)(q22;q22)
- AML with abnormal bone marrow eosinophils inv(16)p13q22) or t(16;16)(p13;q22)
- Acute promyelocytic leukemia - AML with t(15;17)(q22;q12) and variants
- AML with 11q23 abnormalities

Acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia

- Following a myelodysplastic syndrome or myelodysplastic/myeloproliferative disorder
- Without antecedent myelodysplastic syndrome

Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes, therapy-related

- Alkylating agent-related
- Topoisomerase type II inhibitor-related (some may be lymphoid)
- Other types

Acute myeloid leukemia not otherwise categorized

- AML minimally differentiated
- AML without maturation
- AML with maturation
- Acute myelomonocytic leukemia
- Acute monoblastic and monocytic leukemia
- Acute erythroid leukemia
- Acute megakaryoblastic leukemia
- Acute basophilic leukemia
- Acute panmyelosis with myelofibrosis

3.3. LAM con alterazioni della banda cromosomica 11q23

Nelle leucemie con alterazioni della banda cromosomica 11q23, il gene coinvolto è *MLL* (vedi dopo). Nella classificazione WHO delle LAM, le leucemie con alterazioni 11q23/*MLL*, sono nella categoria “AML with recurring genetic abnormalities” (tabella 2), in cui sono definite le seguenti sub-categorie:

- LAM con t(8;21)(q22;q22); *AML1/ETO*;
- LAM con eosinofili anormali nel midollo osseo, inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22); *CBFβ/MYH11*;
- LAM-PML (promielocitica) con t(15;17)(q22;q12); *PML-RARα* e varianti;
- LAM con alterazioni 11q23/*MLL*.

Mentre le prime tre sub-categorie sono malattie omogenee, sia a livello citogenetico che molecolare, e mostrano una stretta correlazione con la morfologia cellulare, le LAM con alterazioni 11q23/*MLL* sono molto eterogenee. Sono già state riportate, in letteratura, 73 associazioni cromosomiche diverse del gene *MLL* e 54 geni partner sono già stati analizzati e clonati a livello molecolare (figura 1).

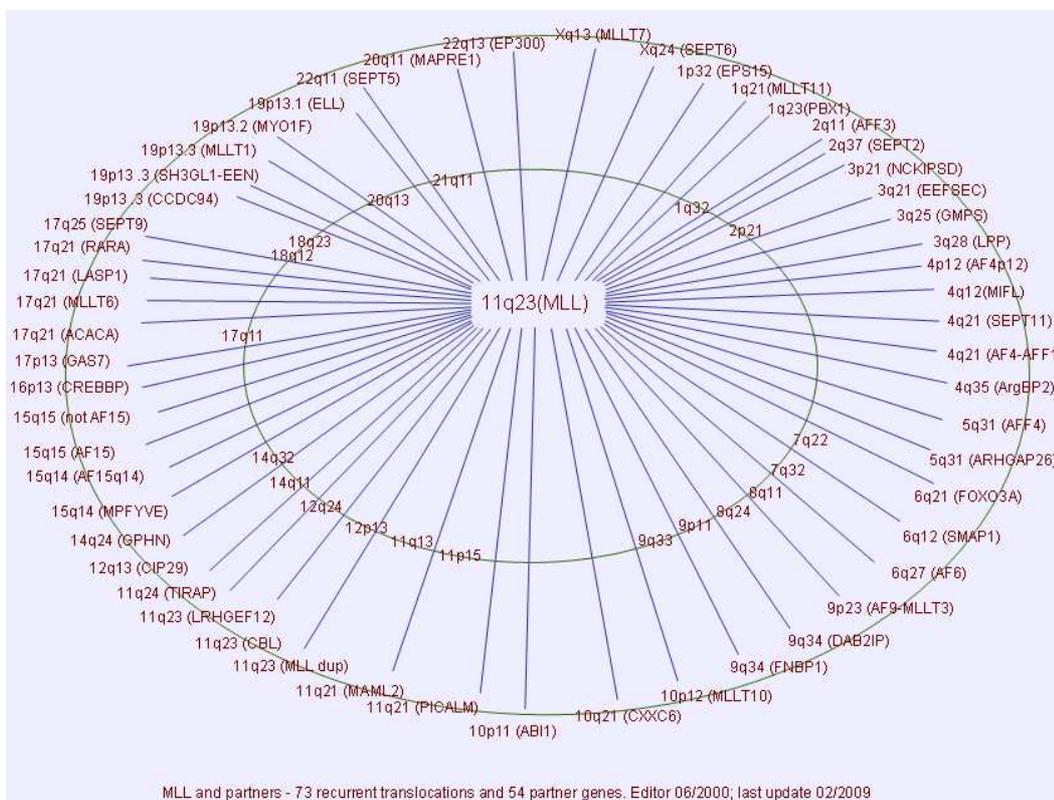


Figura 1. Da <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MLL.html>

I riarrangiamenti cromosomici del sito 11q23/*MLL* comprendono diverse anomalie cariotipiche, tra cui delezioni, duplicazioni, inversioni e traslocazioni reciproche. Nell'insieme, questi riarrangiamenti rendono conto del 5-10% dei riarrangiamenti cromosomici acquisiti in bambini ed adulti con LAM, LAL, leucemie di immunofenotipo misto e sindromi mielodisplastiche (MDS) (Mitelman, 1995).

In generale, negli adulti e negli anziani i riarrangiamenti 11q23/*MLL* sono poco frequenti. Sia nelle LAM che nelle LAL la frequenza dei riarrangiamenti 11q23/*MLL* è < 3% (Schoch *et al.*, 2003; Stock *et al.*, 1994). Invece, nei bambini e nei giovani adulti i riarrangiamenti 11q23/*MLL* sono più frequenti (figura 2).

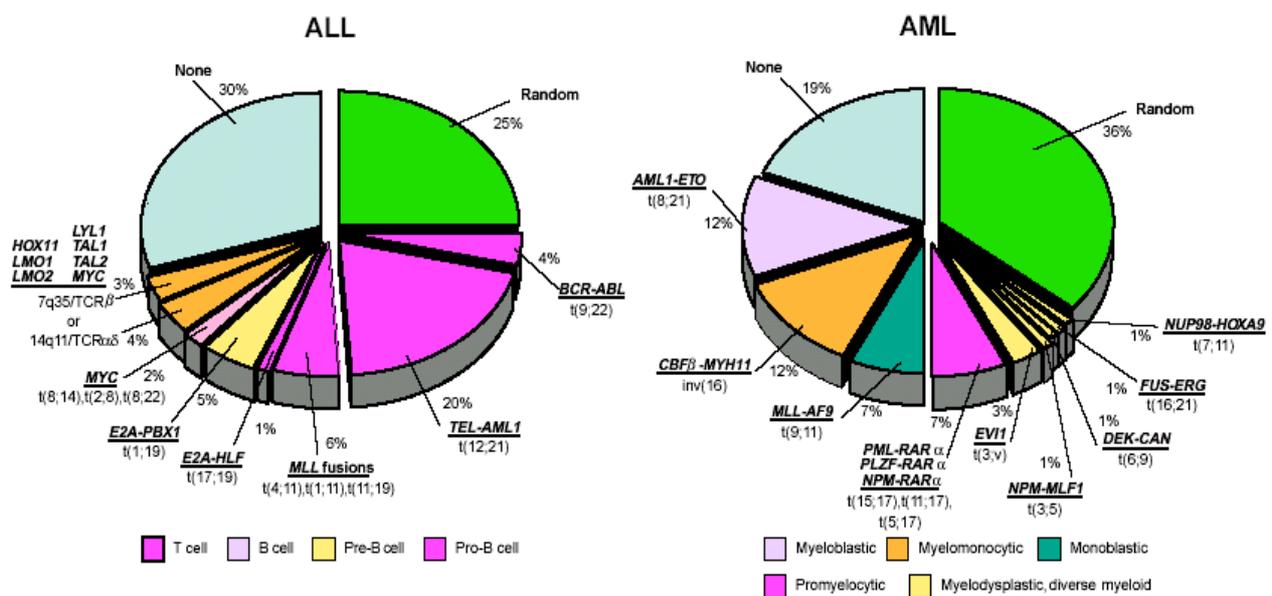


Figura 2. Distribuzione degli oncogeni generati da traslocazioni cromosomiche nelle leucemie di bambini e giovani adulti. I prodotti di questi geni aberranti sono molto spesso proteine nucleari attive nella trascrizione genica. “Random” si riferisce a traslocazioni sporadiche che sono state osservate solo in cellule leucemiche di casi singoli. “None” si riferisce a leucemie che mancano di anomalie geniche identificabili (Look, 1997).

In particolare, i riarrangiamenti 11q23/*MLL* hanno una elevata incidenza nelle leucemie infantili, cioè diagnosticate nei primi 12 mesi di vita. Diversamente dai bambini con più di 1 anno di età, dove le LAL costituiscono l’80% delle neoplasie maligne ematologiche, negli infanti le leucemie linfoidei sono circa il 50-66% dei casi; mentre i casi restanti hanno un fenotipo mieloide. Le leucemie infantili costituiscono il 2.5-5% delle LAL pediatriche e il 6-14% delle LAM pediatriche (Biondi *et al.*, 2000). Rispetto ad un eccesso di maschi tra i bambini più vecchi che hanno una leucemia, c’è una leggera predominanza femminile tra gli infanti con questa patologia.

Il tasso di incidenza generale dei riarrangiamenti 11q23/*MLL* negli infanti, rilevato da diverse metodiche, varia dal 60% all'80% (Biondi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1993; Hilden *et al.*, 1997; Rubnitz *et al.*, 1994a; Taki *et al.*, 1996); tale incidenza è strettamente associata con l'età alla diagnosi e diminuisce rapidamente dopo 1 anno di età (figura 3) (Dimartino and Cleary, 1999; Greaves, 1996).

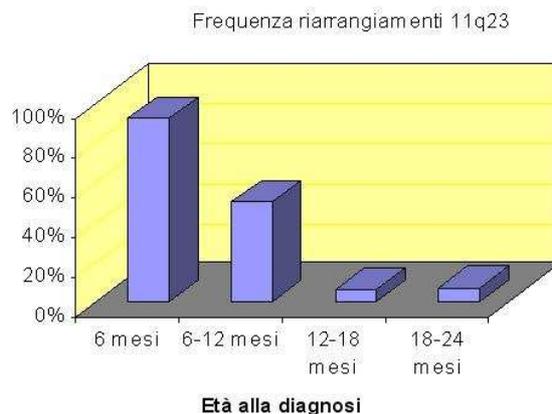


Figura 3. Frequenza dei riarrangiamenti di 11q23/*MLL* nei bambini con leucemia acuta in funzione dell'età alla diagnosi (Dimartino and Cleary, 1999).

I riarrangiamenti 11q23/*MLL* sono rilevati con un'alta frequenza (70%-90%) anche in leucemie acute secondarie, che si originano dopo trattamento anti-neoplastico con inibitori della "Topoisomerasi II", tra cui le antracicline, la actinomicina-D e le epipodofillotossine (etoposide e teniposide) (Andersen *et al.*, 2001; Felix, 2001).

Sebbene siano stati identificati più di 50 differenti geni partner di *MLL* (figura 1), un piccolo gruppo di geni risulta coinvolto in circa l'80% dei casi di leucemie con traslocazione di *MLL*. Nelle traslocazioni 11q23, i 5 geni partner di *MLL* più frequenti sono (figura 4):

- *AF4* in t(4;11)(q21;q23) or *MLL-**AF4***
- *AF9* in t(9;11)(p22;q23) or *MLL-**AF9***
- *ENL* in t(11;19)(q23;p13.3) or *MLL-**ENL***
- *AF10* in t(10;11)(p12;q23) or *MLL-**AF10***
- *AF6* in t(6;11)(q27;q23) or *MLL-**AF6***

Esiste anche un'associazione tra una particolare traslocazione ed il fenotipo delle cellule leucemiche (figura 4). Per esempio, il 95% di casi di t(4;11)(q21;q23) presenta un fenotipo LAL; invece, l'85% di casi di t(9;11)(p22;q23) presenta un fenotipo LAM ed, inoltre, il 75% di tali LAM sono di tipo monocitico (Swansbury *et al.*, 1998).

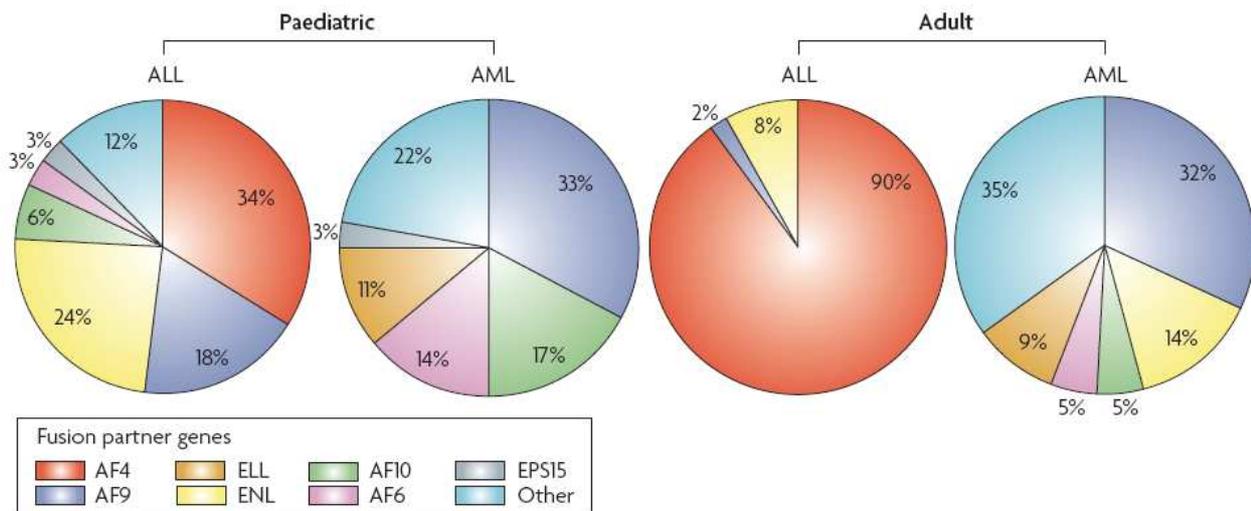


Figura 4. Distribuzione dei principali geni partner di fusione di *MLL* in leucemie *de novo* pediatriche e dell'adulto (Krivtsov and Armstrong, 2007).

Nelle leucemie acute linfoidi, i pazienti con *MLL* riarrangiato hanno una prognosi particolarmente infausta, specialmente se comparati con bambini con altre forme di LAL (Chen *et al.*, 1993); anche leucemie con *MLL* riarrangiato, sia di tipo linfoidi che mieloide, che avvengono dopo trattamento con inibitori della topoisomerasi II hanno una prognosi ugualmente infausta (Felix *et al.*, 1995). Per quanto riguarda le LAM con *MLL* riarrangiato esistono dati contrastanti, in particolare riguardo alla traslocazione più frequente, cioè la t(9;11)(p22;q23). Uno studio riportava una scarsa prognosi per le LAM associate con tutte le anomalie 11q23/*MLL* (Raimondi *et al.*, 1999), mentre altri studi hanno riportato una prognosi più favorevole per le LAM con traslocazione t(9;11)(p22;q23) (Mrozek *et al.*, 1997; Rubnitz *et al.*, 2002). Attualmente, i pazienti adulti e pediatrici con LAM con riarrangiamenti 11q23/*MLL* sono classificati nel gruppo di rischio "intermedio" (Chowdhury and Brady, 2008).

3.4. Struttura del gene *MLL* e relativa proteina codificata

Nei riarrangiamenti 11q23 il gene coinvolto è *MLL*, acronimo di “myeloid/lymphoid, o mixed lineage leukemia” (Ziemin-van der Poel *et al.*, 1991). Tale gene è indicato anche come *ALL-1* (acute lymphoblastic leukemia-1) (Cimino *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1992), per la sua iniziale identificazione in un caso di LAL, e come *HRX* e *HTRX* (homolog of trithorax) (Djabali *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992), per omologia con la proteina “Trithorax” di *Drosophila*. Successivamente, si è deciso di usare *MLL* come nome standard. Il gene *MLL* si estende sulla regione cromosomica 11q23 per circa 90 kb e consiste di 37 esoni di dimensioni variabili tra 65 bp e 4249 bp (figura 5a) (Nilson *et al.*, 1996; Rasio *et al.*, 1996).

Il gene *MLL* codifica una proteina di 3969 aminoacidi con una massa molecolare di 431 kD, che contiene diversi motivi strutturali (figura 5b). La proteina matura *MLL* consiste di due subunità associate in modo non-covalente: MLL^N (300 kDa) e MLL^C (180 kDa). Queste subunità sono prodotte mediante taglio proteolitico di *MLL* ad opera della proteasi “Taspasi 1”, dopo i residui aminoacidici 2,666 (sito di clivaggio 1 (CS1)) e 2,718 (CS2). Il processamento di *MLL* avviene rapidamente dopo la traduzione ed è seguito da fosforilazione di MLL^C (Hsieh *et al.*, 2003a; Hsieh *et al.*, 2003b; Takeda *et al.*, 2006; Yokoyama *et al.*, 2002)

3.4.1. Motivi strutturali della porzione amino-terminale di *MLL* (MLL^N)

Motivi AT hook: ATH 1-3. Nella parte più iniziale della regione N-terminale vi sono 3 brevi motivi detti “AT hook”, formati da aminoacidi basici conservati. I motivi “A-T hook” sono insoliti in quanto essi riconoscono la struttura del DNA, piuttosto che una sequenza nucleotidica (Tkachuk *et al.*, 1992; Zeleznik-Le *et al.*, 1994) e interagiscono con diverse proteine, tra cui Menin, SET/TAF1 (template-activating factor-1), PP2A (protein phosphatase 2A) and GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible protein 34) (Krivtsov and Armstrong, 2007).

Sequenze di localizzazione nucleare: SNL1 e SNL2. Subito dopo i motivi “A-T hook”, si trovano due brevi sequenze conservate dette SNL1 e SNL2; tali sequenze dirigono la proteina *MLL* (wild-type e di fusione) nel nucleo ed in distinti domini sub-nucleari (Yano *et al.*, 1997). Entrambe queste sequenze sono altamente conservate e si trovano anche nella proteina TRX di *Drosophila*.

Dominio TRD (transcriptional repression domain). Dopo le sequenze SNL1 ed SNL2 si trova un dominio di repressione trascrizionale (TRD) in grado di reprimere la trascrizione quando legato al DNA in vicinanza di un promotore (Prasad *et al.*, 1995; Zeleznik-Le *et al.*, 1994). TRD consiste di due subunità funzionali, RD1 and RD2. RD1 contiene una regione ricca di cisteine, detta motivo “CxxC zinc-finger”, che presenta omologia di sequenza con il dominio non catalitico di due DNA metiltransferasi: la DNA metiltransferasi mammifera (DMT) e la proteina MBD1 (methyl binding domain protein 1) (Cross *et al.*, 1997; Hendrich and Bird, 1998). RD1 può reclutare proteine come HPC2 (Human polycomb 2) and il co-repressore trascrizionale CtBP (C-terminal-binding protein). RD2 recluta le iston-deacetilasi HDAC1 e HDAC2 (Xia *et al.*, 2003).

Dominio PHD (Plant Homeo Domain). I motivi PHD zinc-finger sono regioni conservate tra MLL e la proteina TRX di *Drosophila*. Diversamente dai classici zinc-finger, che mediano il legame al DNA di molti fattori di trascrizione, i motivi PHD sembrano funzionare nelle interazioni proteina-proteina (Aasland *et al.*, 1995). Questi domini mediano l'omodimerizzazione ed il legame di MLL a Cyp33, una ciclofilina nucleare (Fair *et al.*, 2001).

3.4.2. Motivi strutturali della porzione carbossi-terminale di MLL (MLL^C)

Dominio TA (transcriptional activation). Questo dominio ha mostrato di attivare la trascrizione di un gene reporter quando tale regione è espressa in fusione con il dominio che lega il DNA GAL4 (Zeleznik-Le *et al.*, 1994). Quindi, MLL contiene sia un dominio con attività di repressione trascrizionale, che un forte dominio di transattivazione (Prasad *et al.*, 1995), che interagisce anche con il co-attivatore trascrizionale CBP (CREB-binding protein) (Ernst *et al.*, 2001).

Dominio SET (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax). Alla fine della regione C-terminale di MLL si trova un dominio altamente conservato e strutturalmente omologo a quello della proteina TRX di *Drosophila*. Il dominio SET possiede una specifica attività di iston-metiltransferasi, ovvero esso metila l'istone H3, alla lisina 4 (Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002). Il dominio SET di MLL

interagisce con varie proteine, tra cui Sbf-1 and INI1/hSNF5 (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 1998).

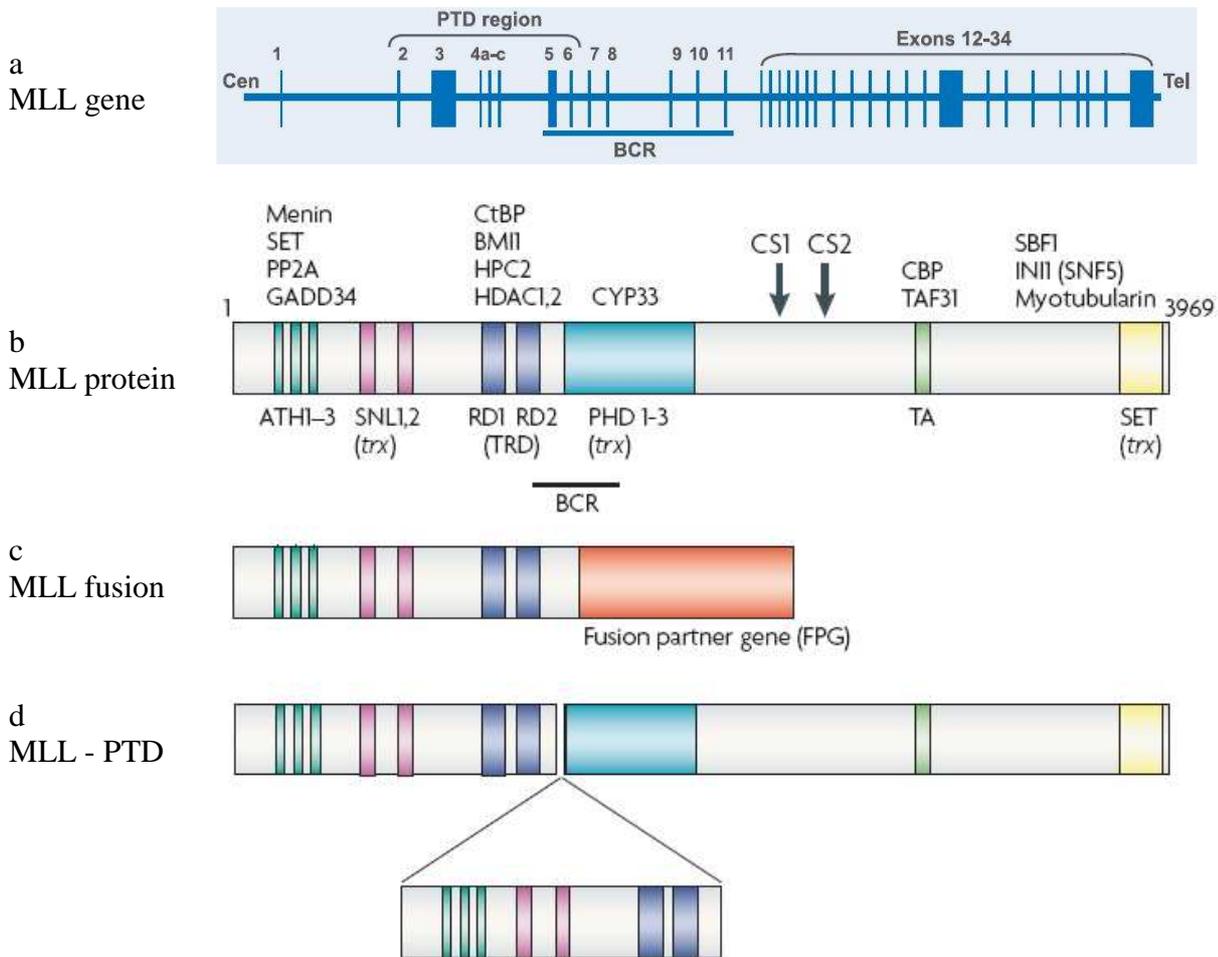


Figura 5. Rappresentazione schematica di:

a) gene *MLL*; BCR (breakpoint cluster region) comprende quasi tutti i breakpoints delle traslocazioni di *MLL* conosciute; PTD (partial tandem duplication; see after).

b) proteina *MLL* con i differenti domini; le proteine che si legano a specifici domini sono annotate sopra ciascun dominio;

c) proteine di fusione generate da traslocazioni di *MLL*; una tipica proteina di fusione di *MLL* contiene la parte N-terminale di *MLL* codificata dai primi 5-11 esoni e la parte C-terminale del gene partner di fusione (FPG).

d) il riarrangiamento di *MLL* che risulta dalla duplicazione parziale di *MLL* (*MLL-PTD*, *MLL*-partial tandem duplication); *MLL-PTD* contiene un numero variabile di esoni da 5 a 12 duplicati ed inseriti prima dell'esone 11 o 12.

La dimensione degli esoni, le distanze introniche e la dimensione dei domini non sono in scala (Harper and Aplan, 2008; Krivtsov and Armstrong, 2007).

3.5. Espressione e Funzione di MLL

MLL è ampiamente espresso nella maggior parte delle cellule umane (Butler *et al.*, 1997). Nel tessuto emopoietico, *MLL* è espresso nelle cellule staminali e nei precursori emopoietici e può essere presente anche in alcune cellule più mature, sia adulte che fetali (Kawagoe *et al.*, 1999). Studi immunocistochimici hanno rivelato che sia la proteina *MLL* wild-type che le proteine di fusione di *MLL* localizzano sia nel nucleo che nel citoplasma; tuttavia, mentre la localizzazione citoplasmatica è diffusa e variabile, quella nucleare è caratterizzata da accumulo perinucleare e localizzazione con distinti corpi nucleari (Butler *et al.*, 1997; Ennas *et al.*, 1997; Rogaia *et al.*, 1997).

La funzione di *MLL* è richiesta per lo sviluppo normale del topo. Topi con una mutazione omozigote per *Mll* (*Mll*^{-/-}) muoiono nel periodo embrionale, mostrando diversi difetti nello sviluppo, tra cui anche anomalie ematopoietiche (Hess *et al.*, 1997; Yagi *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1995). Questi studi hanno evidenziato che *MLL* funziona come una controparte mammifera della proteina “TRX” di *Drosophila*, che mantiene positivamente, durante lo sviluppo, l’espressione di molti geni *HOX* (geni omeotici coinvolti in molti processi dello sviluppo, tra cui anche l’ematopoiesi). Infatti, sebbene negli embrioni, al giorno 9.5 di gestazione, viene osservato il corretto inizio dell’espressione di diversi geni *HOX* esaminati (*a7*, *c8* e *c9*), il loro successivo mantenimento viene perso (Yu *et al.*, 1998). Per valutare il ruolo di *MLL* nell’ematopoiesi, sono stati generati topi *Mll*^{-/-} che morivano al giorno embrionico 10.5-11.5 (E10.5-11.5) (Hess *et al.*, 1997). Analizzando l’ematopoiesi di colture di sacco vitellino, è stato trovato che in topi *Mll*^{-/-} il numero e la dimensione delle CFU-GEMM (colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte), CFU-M (colony-forming unit-macrophage) e BFU-E (burst-forming unit-erythroid) sono marcatamente diminuiti; il numero e la dimensione delle CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte macrophage) e CFU-G (colony-forming unit-granulocyte) sono moderatamente diminuiti; infine il numero e la dimensione delle CFU-E (colony-forming unit-erythroid) non sono in pratica influenzati. Nonostante il numero minore di colonie presenti, le colture di topi *Mll*^{-/-} mostrano tutti i tipi cellulari, senza evidenza di arresto della maturazione. In questo studio, l’iniziale mortalità degli embrioni *Mll*^{-/-} precludeva valutazioni del ruolo di *MLL* nell’ematopoiesi del fegato fetale o nel midollo osseo adulto, e il ruolo di *MLL* nella linfopoiesi. In un altro studio, sono stati generati topi *Mll*^{-/-} che morivano più tardi

nel periodo embrionale, ad E11.5-14.5 (Yagi *et al.*, 1998). In questo caso è stato possibile analizzare l'ematopoiesi del sacco vitellino e del fegato fetale. Saggi di formazione di colonie hanno mostrato che, in questo tipo di mutanti *Mill*^{-/-}, il numero e la dimensione delle colonie è marcatamente ridotto e molte delle colonie ritardano ad essere riconosciute; questo risultato influenza tutte le linee di differenziazione, anche se le colonie GM erano ridotte in misura maggiore. Anche in questo caso l'esame istologico ha rivelato che sono presenti tutti i tipi cellulari maturi (vi sono infatti cellule eritroidi, mieloidi, monocitiche e megacariocitiche), con una normale differenziazione. In conclusione, questi studi indicano che la funzione di *MLL* sarebbe richiesta per il normale numero di progenitori ematopoietici, specialmente lungo le vie mieloidi e macrofagiche; ciò suggerisce che l'espressione di *MLL* sia richiesta per la normale proliferazione e/o sopravvivenza dei progenitori ematopoietici. Invece, la funzione di *MLL* non sembra influenzare il differenziamento delle cellule emopoietiche.

A livello molecolare, entrambi i frammenti di *MLL* (*MLL*^N e *MLL*^C) fanno parte di un supercomplesso proteico molto grande, composto da circa 30 proteine (Nakamura *et al.*, 2002). Questo supercomplesso coordina la modificazione della cromatina, mediante processi come la metilazione e l'acetilazione delle proteine istoniche. I due frammenti di *MLL* mostrano opposte proprietà trascrizionali, quando analizzati separatamente; in particolare, *MLL*^N ha un'attività di repressione trascrizionale, mentre *MLL*^C ha forti proprietà di attivazione trascrizionale (Yokoyama *et al.*, 2002). Quando i due frammenti di *MLL* sono insieme, si ha globalmente una regolazione positiva della trascrizione genica, con il frammento *MLL*^N che serve per indirizzare il complesso di *MLL* alle giuste localizzazioni nucleari. Da notare che sia *MLL* che *TRX* di *Drosophila* sono regolatori positivi dell'espressione genica, durante lo sviluppo embrionale (Brock and van Lohuizen, 2001). Molto probabilmente i fattori di trascrizione reclutano il complesso di *MLL* per iniziare la sintesi di RNA. Ovviamente, certi geni, come particolari geni *HOX*, dipendono di più di altri dall'azione di *MLL* e, perciò, essi si distinguono se viene meno la funzione di *MLL* (Slany, 2009).

3.6. Riarrangiamenti del gene *MLL*

La proprietà più sorprendente dei geni partner di *MLL*, nelle traslocazioni 11q23, è la loro incredibile diversità (figura 1). Tuttavia, malgrado tale enorme varietà, la maggior parte delle leucemie con traslocazioni di 11q23/*MLL* si presenta come un'entità clinica ben distinta; infatti, analisi di espressione genica, effettuate in cellule di blasti leucemici, derivanti da pazienti, ed in linee cellulari stabilizzate *in vitro*, non sono riuscite a separare le differenti fusioni di *MLL* in base al rispettivo gene partner di fusione (Armstrong *et al.*, 2002; Ferrando *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2003; Yeoh *et al.*, 2002). Perciò, è lecito chiedersi come sia possibile che una moltitudine di differenti proteine di fusione di *MLL* possa causare, alla fine, un tipo di malattia abbastanza simile. Due osservazioni possono essere utili, per affrontare tale problema.

Primo, in tutte le traslocazioni di *MLL* è coinvolta solo la sequenza genica che codifica per il frammento MLL^N ; in particolare, il gene partner viene fuso, in frame, con la sequenza genica di *MLL*, subito dopo la parte codificante per il dominio "CxxC" ed escludendo, quasi invariabilmente, quella codificante per i motivi "PHD fingers". Studi di struttura/funzione hanno rivelato che sia i motivi AT hook che il dominio TRD sono cruciali per l'oncogenesi (Slany *et al.*, 1998). È stato riportato che, al contrario, i motivi "PHD fingers" bloccano la trasformazione leucemica, mediata dalle proteine di fusione di *MLL*, fornendo così una spiegazione del perché nelle traslocazioni di *MLL* tali domini vengano sempre esclusi (Chen *et al.*, 2008a; Muntean *et al.*, 2008).

Secondo, i geni fusi a *MLL* chiaramente appartengono a poche classi funzionali. Infatti, i geni *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10* ed *ELL*, che costituiscono approssimativamente oltre l'80% di tutti i casi clinici di leucemie con alterazioni di *MLL*, codificano delle proteine che presentano proprietà di attivazione della trascrizione genica. La tabella 3 mostra diversi geni fusi ad *MLL*, raggruppati in base alla loro funzione.

Tabella 3. Classificazione di geni partner di fusione di MLL (Krivtsov and Armstrong, 2007).

	Putative function	Chromosome	Fusion partner	Frequency in leukaemia
Group 1	Nuclear, putative DNA-binding proteins	4q21	<i>AF4</i>	>80% of <i>MLL</i> rearranged leukaemias
		9p23	<i>AF9</i>	
		19p13.3	<i>ENL</i>	
		10p12	<i>AF10</i>	
		19p13.1	<i>ELL</i>	
Group 2	Cytoplasm, presence of coiled-coil oligomerization domain	1q32	<i>EPS15</i>	>10%
		17p13	<i>GAS7</i>	
		19p13	<i>EEN</i>	
		6q27	<i>AF6</i>	
		Xq13	<i>AFX</i>	
Group 3	Cytoplasm, septin family, interact with cytoskeletal filaments, have a role in mitosis	Xq22	<i>SEPT2</i>	>1%
		22q11	<i>SEPT5</i>	
		Xq24	<i>SEPT6</i>	
		17q25	<i>SEPT9</i>	
		4q21	<i>SEPT11</i>	
Group 4	Nuclear, histone acetyltransferases	16q13	<i>CBP</i>	>1%
		22q13	<i>P300</i>	
Group 5	MLL partial tandem duplication of exons 5–11 (<i>MLL-PTD</i>)	11q23	N/A	4–7% of all AML with normal karyotype

AML, acute myeloid leukaemia; CBP, CREB binding protein; MLL, mixed lineage leukaemia; N/A, not applicable; PTD, partial tandem duplication.

3.7. Gene di fusione *MLL-AF9* - LAM con traslocazione *t(9;11)(p22;q23)*

Nelle traslocazioni 11q23/*MLL*, il gene di fusione sul cromosoma 11 è formato all'estremità 5' dai primi 5-11 esoni di *MLL* e all'estremità 3' dalle sequenze del gene partner (figura 5c). Come già detto, la traslocazione *t(9;11)(p22;q23)* è la traslocazione più comune rilevata nelle LAM con riarrangiamento 11q23/*MLL* ed è associata con il fenotipo monocitico (M5 della classificazione FAB). Nella traslocazione *t(9;11)(p22;q23)* *MLL* si ricombina con il gene *AF9* per formare il gene di fusione *MLL-AF9* (figura 6). La regione BCR (breakpoint cluster region) di *AF9* presenta gli stessi elementi strutturali della BCR di *MLL* e ciò rende possibili eventi di ricombinazione tra i due geni (Strissel *et al.*, 2000).

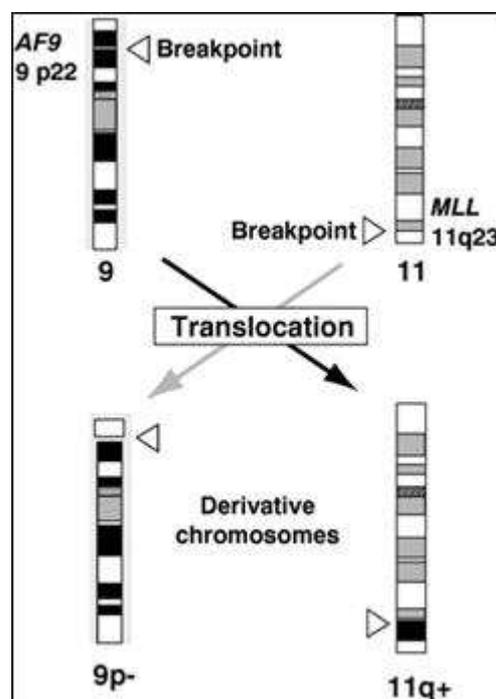


Figura 6. Schema della ricombinazione tra *MLL* e *AF9*.

Il gene umano *AF9* wild-type, detto anche *LTG9* o *MLLT3*, consiste di 11 esoni e codifica una proteina di 568 aminoacidi, con una massa molecolare di 633,67 kD (Iida *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994), caratterizzata da:

- una sequenza di localizzazione nucleare (che dirige la proteina nel nucleo).
- domini ricchi di serine, tra cui uno contenente 42 serine continue.
- tratti ricchi di proline o di aminoacidi basici.

È stato dimostrato che, domini con molte proline (Mitchell and Tjian, 1989) o regioni ricche di serine e proline (Theill *et al.*, 1989) agiscono come attivatori della trascrizione e che, domini ricchi di aminoacidi carichi positivamente si legano al DNA. Ciò aveva subito suggerito che la proteina *AF9* poteva essere coinvolta nella regolazione della trascrizione genica (Nakamura *et al.*, 1993). Infatti, è stato dimostrato che questa proteina possiede attività di regolazione trascrizionale (Prasad *et al.*, 1995). La proteina *AF9* è altamente omologa alla proteina *ENL*, codificata dal gene *ENL*, altro gene partner di *MLL*. Anche la proteina *ENL* funziona come attivatore della trascrizione genica (Rubnitz *et al.*, 1994b).

3.8. Geni e proteine target di MLL e proteine di fusione di MLL

Profili di espressione genica hanno dimostrato una up-regolazione di un gruppo di geni *HOX*, tra cui *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10* e *HOXC6*, in cellule leucemiche con riarrangiamenti del gene *MLL* (Armstrong *et al.*, 2002; Ferrando *et al.*, 2003). È stato dimostrato che la trasformazione neoplastica indotta dalle proteine di fusione di *MLL* richiede l'espressione di geni *HOX*, come *HOXA7* e *HOXA9* (Ayton and Cleary, 2003). Negli esseri umani e nei topi, i geni *HOX* sono organizzati in quattro clusters, presenti su differenti cromosomi (figura 7). L'ordine dei geni *HOX* in ciascun cluster è evolutivamente conservato, suggerendo che l'organizzazione fisica dei geni *HOX* possa essere essenziale per la loro espressione (Graham *et al.*, 1989). I geni *HOX* sono espressi durante l'embriogenesi in modo tessuto specifico e, spesso, anche in base alla fase differenziativa cellulare (Magli *et al.*, 1991). I geni *HOX* sono espressi anche nel tessuto emopoietico, in particolare è stato mostrato che cellule a varie fasi del differenziamento emopoietico presentano differenti modelli di espressione dei geni *HOX*; inoltre, tali geni *HOX* sono trascrizionalmente accesi o spenti in blocchi, che possono contenere un numero variabile di geni contigui all'interno di ciascun *locus* genico (Magli *et al.*, 1991).

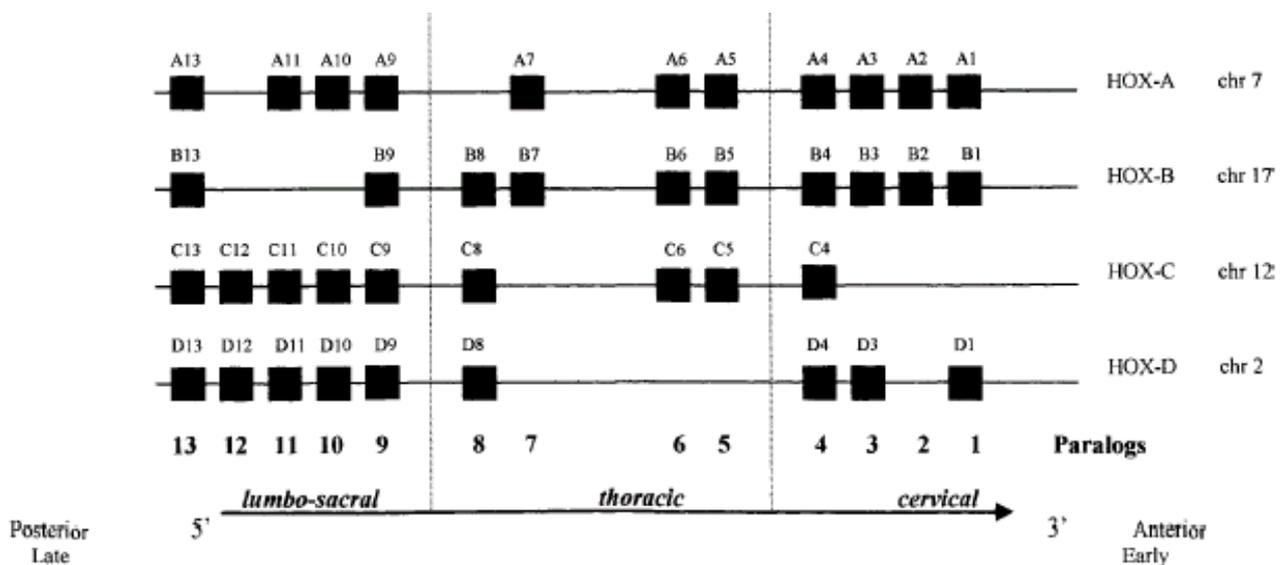


Figura 7. Rappresentazione schematica dei geni *HOX*. I geni sono allineati orizzontalmente secondo la loro posizione cromosomica e verticalmente in base alla massima omologia di sequenza (Cillo *et al.*, 2001).

L'induzione ed il mantenimento della leucemogenesi indotta da riarrangiamenti 11q23/*MLL* richiede anche la proteina MEIS1 (Mouse Ecotropic Integration Site 1), a cofattore delle proteine HOX (Wong *et al.*, 2007). Il gene *MEIS1* è notevolmente espresso nelle leucemie con alterazioni 11q23/*MLL* e rappresenta un importante collaboratore oncogenico (Armstrong *et al.*, 2002). È stato riportato che, in un modello murino, *Meis1* regolava la frequenza ed il potenziale delle cellule staminali leucemiche con *Mll* riarrangiato, mediante il controllo dell'attività del ciclo cellulare, dell'estensione dell'auto-rinnovamento e dell'arresto della differenziazione cellulare; inoltre, *Meis1* regolava anche il tasso di generazione di cellule staminali leucemiche da progenitori mieloidi, in vivo (Wong *et al.*, 2007).

Esiste un legame funzionale tra proteine di fusione di *MLL* e *MYC*. Il proto-oncogene *MYC* codifica per un fattore di trascrizione, espresso in molti tessuti normali e neoplastici, tra cui cellule emopoietiche. La funzione di *MYC* è implicata in vari processi cellulari, tra cui proliferazione, perdita del differenziamento, apoptosi ed adesione cellulare (Coller *et al.*, 2000; Pelengaris *et al.*, 2002). È stato dimostrato che, varie oncoproteine di *MLL*, tra cui anche *MLL-AF9*, attivano la trascrizione di alcuni geni regolati da *MYC* (Galoian *et al.*, 2000). Tali geni possiedono delle sequenze di riconoscimento (E-boxes) per *MYC* e mutazioni puntiformi in tali sequenze di consenso aboliscono l'attività di trans-attivazione indotta dall'espressione di *MLL-AF9* e di altre oncoproteine di *MLL*. Inoltre, l'analisi di cellule *MYC* *+/+* e *MYC* *-/-* ha confermato che la trans-attivazione dovuta alle oncoproteine di *MLL* è mediata, in modo specifico, attraverso *MYC*. Sembra che le oncoproteine di *MLL* possano potenziare il legame di *MYC* alle sue sequenze target, poiché i livelli proteici di *MYC* non sono influenzati dall'espressione delle oncoproteine di *MLL*. La trans-attivazione mediata dalle oncoproteine di *MLL* richiede i domini AT hook ed il dominio di repressione TRD di *MLL*, più le sequenze del partner di traslocazione; tale trans-attivazione è molto più forte (più di 100 volte) di quella osservata per *MLL* wild-type (Galoian *et al.*, 2000).

Nelle leucemie indotte da oncoproteine di *MLL*, si stanno cercando anche i mediatori a valle dei geni target regolati direttamente da tali oncoproteine. È stato già detto che l'espressione di oncogeni come *MLL-AF9* induce una iper-espressione di specifici geni *HOX* e loro cofattori, come *MEIS1*, indicando un ruolo centrale ed importante del pathway *HOXA/MEIS1* durante la leucemogenesi indotta dagli

oncogeni di *MLL*. In un modello murino, uno dei geni che mostrava la più pronunciata up-regolazione in risposta alla combinazione di *Hoxa9* e *Meis1* era *Myb*, l'omologo cellulare dell'oncogene v-myb (myeloblastosis leukemia virus) (Hess *et al.*, 2006). I livelli di *MYB* sono elevati in molte leucemie ed esso ha una funzione critica nello sviluppo delle cellule staminali emopoietiche (Ramsay and Gonda, 2008). Quindi, *MYB* potrebbe essere un trasmettitore cruciale di segnali oncogenici dal pathway *HOXA/MEIS1*, e suoi regolatori a monte (es. oncogeni di *MLL*), al controllo della crescita delle cellule leucemiche (Hess *et al.*, 2006).

3.9. Terapia attuale per le LAM con riarrangiamenti 11q23/MLL

Attualmente, le LAM con riarrangiamenti 11q23/*MLL* sono trattate con farmaci utilizzati anche in altri tipi di LAM. Tra quelli più efficaci troviamo:

- Citarabina (1-β-D-arabinofuranosylcytosine, cytosine arabinoside o ARA-C). Il suo meccanismo d'azione è dovuto alla sua rapida conversione in citosina arabinoside trifosfato, che danneggia il DNA quando la cellula si trova nella fase S (sintesi del DNA) del ciclo cellulare; in particolare, l'ARA-C inibisce la funzione di alcuni enzimi necessari per la sintesi del DNA (DeVita *et al.*, 2004).
- Antracicline (esempi, doxorubicina, daunorubicina e idarubicina). Il principale meccanismo d'azione delle antracicline riguarda l'inibizione della topoisomerasi II. Inoltre, le antracicline provocano la produzione di radicali liberi e conseguenti danni cellulari strutturali (perossidazione lipidica), responsabili della cardiotoxicità di tali farmaci (DeVita *et al.*, 2004).
- Etoposide. È un'epipodofillotossina ed è anch'esso un inibitore dell'enzima topoisomerasi II. Le cellule neoplastiche mostrano maggiore sensibilità a tale molecola nelle fasi S e G₂ del ciclo cellulare. Il conseguente accumulo di danni al DNA diviene alla fine incompatibile con la sopravvivenza cellulare (DeVita *et al.*, 2004).

In generale, per quanto riguarda le LAM pediatriche, il trattamento combinato con questi farmaci permette di ottenere la remissione completa in oltre l'80% dei casi e tassi di sopravvivenza tra il 40% ed il 60%. Risultati recentemente pubblicati di studi clinici di fase III, riguardanti LAM pediatriche sono elencati in tabella 4. come già detto, per quanto riguarda i pazienti con LAM con riarrangiamenti 11q23/*MLL*, essi sono inclusi nel gruppo di rischio "intermedio" (Chowdhury and Brady, 2008).

I principali problemi nel trattamento delle LAM pediatriche sono rappresentati dalle morti relative al trattamento e dagli effetti collaterali a lungo termine. Ciò ostacola ulteriori intensificazioni delle terapie attuali e, quindi, rende necessaria la ricerca di nuove molecole e nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle LAM pediatriche.

Tabella 4. Risultati recentemente pubblicati di studi clinici di fase III in LAM pediatriche (Kaspers and Zwaan, 2007).

Study group	Protocol	n	Time period	Follow-up time	pEFS	pOS	Ref.
AEIOP	AEIOP LAM 92	160	1992-2001	5 years	54%	60%	(Pession <i>et al.</i> , 2005)
AML-BFM SG	AML-BFM 93	471	1993-1998	5 years	51%	60%	(Creutzig <i>et al.</i> , 2001)
CCG	CCG 2891	294	1989-1995	3 years	27%	39%	(Woods <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Standard timing</i>			8 years	—	34%	
	CCG 2891	295	1989-1995	3 years	42%	51%	
	<i>Intensive timing</i>			8 years	—	49%	
DCOG	AML-92/94	78	1992-1998	5 years	42%	42%	(Kardos <i>et al.</i> , 2005)
EORTC	EORTC 58921	177	1993-2000	5 years	49%	62%	(Entz-Werle <i>et al.</i> , 2005)
LAME	LAME 89/91	309	1988-1996	6 years	48%	60%	(Perel <i>et al.</i> , 2002)
MRC	AML12	529	1995-2002	5 years	58%	68%	(Gibson <i>et al.</i> , 2005)
NOPHO	AML 93	219	1993-2000	7 years	49%	64%	(Lie <i>et al.</i> , 2003)
POG	POG 9421	565	1995-1999	3-years	36%	54%	(Becton <i>et al.</i> , 2006)
PPLSG	AML 98	104	1998-2002	5-years	47%	50%	(Dluzniewska <i>et al.</i> , 2005)
St. Jude Children's Research Hospital	AML 91	62	1991-1997	5-years	44%	57%	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2005)
Tokyo CCSG	AML13/14	216	1991-1998	5-years	56%	62%	(Tomizawa <i>et al.</i> , 2007)

AEIOP: Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica; AML-BFM SG: AML Berlin-Frankfurt-Münster Study Group; CCG Children's Cancer Group (now with POG the Children's Oncology Group); DCOG: Dutch Childhood Oncology Group; EORTC: European Organization of Research and Treatment of Cancer; LAME: Leucémie Aiguë Myéloblastique Enfant; MRC: Medical Research Council; NOPHO: Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology; POG: Pediatric Oncology Group (now with CCG the Children's Oncology Group); PPLSG: Polish Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group.

3.10. Nuove strategie terapeutiche per le LAM con 11q23/MLL rearrangements.

Terapia differenziante

Un'anormalità caratteristica delle cellule leucemiche è che esse sono “bloccate” ad una fase precoce del loro sviluppo e non riescono a differenziare in cellule funzionalmente mature. Quindi, una strategia antileucemica, attualmente in studio, è quella di cercare di indurre le cellule neoplastiche a superare il loro blocco differenziativo; tale strategia è nota come “terapia differenziante”. Tale intervento potrebbe limitare gli effetti collaterali della chemioterapia citotossica e migliorare i tassi di remissione e di cura. Il potenziale di tale approccio terapeutico è esemplificato dallo sviluppo della terapia differenziante per il trattamento della leucemia acuta promielocitica (LAP) (Nowak *et al.*, 2009; Petrie *et al.*, 2009). La figura 8 mostra alcune tappe fondamentali nella storia della terapia differenziante della LAM ed, in particolare, l'applicazione nel trattamento della LAP.

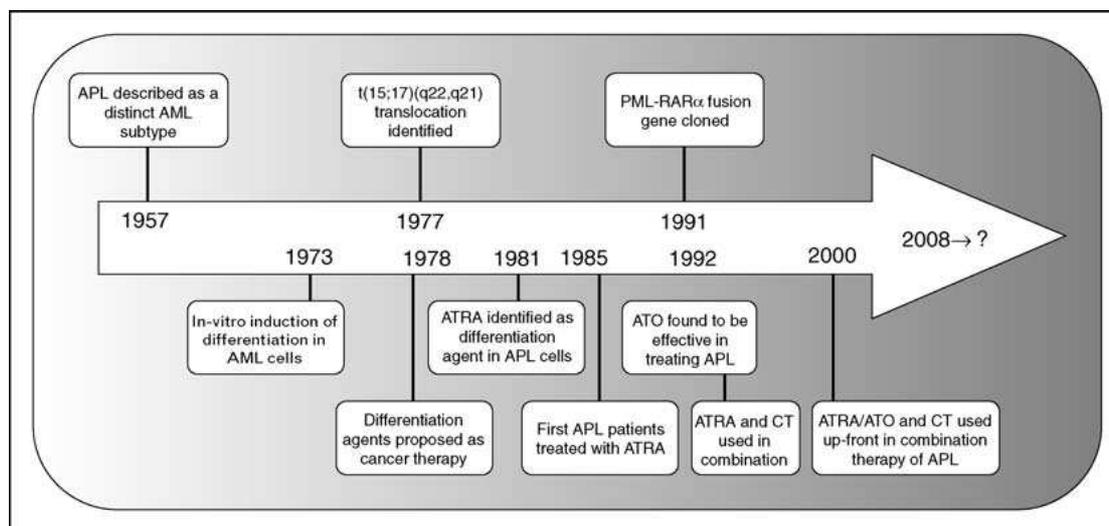


Figura 8. Tappe fondamentali nella storia della terapia differenziante della LAM. In alto sono indicati alcuni eventi associati con la caratterizzazione della LAP. In basso sono mostrati alcuni eventi associati con la terapia differenziante. ATRA (all-trans-retinoic acid), ATO (arsenic trioxide), CT (chemioterapia) (Petrie *et al.*, 2009).

Attualmente, la terapia della LAP consiste di una “fase di induzione” della remissione di malattia, mediante trattamento basato sull’ATRA e cicli di chemioterapia in fase di post-remissione. Tale trattamento combinato risulta in tassi di remissione a lungo termine di oltre il 90% di casi di LAP (Dohner *et al.*, 2009; Testi *et al.*, 2005).

La “terapia differenziante” della LAP, basata sull’utilizzo dell’ATRA, potrebbe essere di esempio per lo sviluppo di simili trattamenti in altri tipi di leucemie, prendendo in considerazione anche altre molecole “differenzianti” (oltre all’ATRA), da utilizzare singolarmente o in combinazione.

Composti della Vitamina D

Come per i retinoidi, effetti differenzianti promettenti furono anche dimostrati per la forma fisiologicamente attiva della vitamina D, conosciuta come: 1,25-dihydroxycholecalciferol (1,25-dihydroxyvitamin-D₃; calcitriolo; VD₃). La VD₃ induce il differenziamento di normali precursori mieloidi verso il *lineage* monocitico (Grande *et al.*, 2002). Anche in molte linee cellulari leucemiche mieloidi indifferenziate, la VD₃ stimola il differenziamento monocitico (Grande *et al.*, 1997; Studzinski *et al.*, 1993). La VD₃ si lega al recettore nucleare per la VD₃ (VDR), che eterodimerizza con il cettore X dell’acido retinoico (RXR); questo complesso attivato si lega ad elementi di risposta alla VD₃ (VDREs), nelle regioni promotrici di geni che inducono arresto del ciclo cellulare e differenziamento, nelle cellule leucemiche (Nowak *et al.*, 2009). Purtroppo, la VD₃ ha dimostrato scarsa efficacia in pazienti con LAM ed altre neoplasie. Tale risultato è dovuto principalmente al fatto che l’applicazione clinica della VD₃ è limitata dai suoi effetti collaterali ipercalcemici (Luong and Koeffler, 2005; Nowak *et al.*, 2009).

Citochine

Il differenziamento di progenitori emopoietici in cellule ematiche mature è controllato anche dall’azione di diverse citochine, tra cui i fattori che stimolano le colonie emopoietiche, le interleuchine, l’interferon-gamma ed il fattore di necrosi tumorale. La trasduzione del segnale fisiologico di citochine emopoietiche consiste nel loro legame ai propri recettori specifici di membrana e successive attivazione di pathways a valle, tra cui quelli della “protein kinase C (PKC)”, “mitogen activated protein kinase (MAPK)”, “Janus kinases (JAKs)”, “Src kinase” e “STATs”. L’attivazione di tali pathways, a sua volta, induce l’attivazione o la repressione

trascrizionale di geni che regolano il differenziamento dei progenitori emopoietici (Nowak et al., 2009; Ravandi, 2006).

È stato riportato che le cellule leucemiche (sia linee cellulari che blasti derivati da pazienti) sono, nella maggior parte dei casi, resistenti al differenziamento indotto da citochine, anche esprimendo i rispettivi recettori non mutati e funzionali. Tuttavia, il differenziamento terminale può essere indotto da alcune citochine, in cellule leucemiche, ma a concentrazioni di molto superiori a quelle utilizzabili in clinica. Quando avviene il differenziamento, diversi proto-oncogeni, come *MYB*, *MYC*, *FOS*, ecc. vengono regolati in maniera differente da parte delle citochine utilizzate (Nowak et al., 2009; Ravandi, 2006).

Purtroppo, l'uso di tali molecole come agenti antileucemici non si è rivelato finora utile. Anche in questo caso, il principale problema è che non si riescono a raggiungere, nei pazienti, quelle concentrazioni di citochine utili per ottenere il differenziamento, che invece si possono raggiungere *in vitro* (Nowak et al., 2009; Ravandi, 2006).

Modificatori epigenetici

L'epigenetica si riferisce ad una serie di modificazioni biochimiche della cromatina, che coinvolgono sia il DNA che i complessi proteici ad esso associati, con il risultato di influenzare l'espressione genica, senza alterare la sequenza primaria del DNA (Jones and Baylin, 2007; Robertson and Wolffe, 2000).

Una differenza fondamentale tra alterazioni genetiche ed epigenetiche è la natura irreversibile delle lesioni genetiche, mentre quelle epigenetiche sono potenzialmente reversibili, permettendo così un intervento terapeutico. Quindi, potrebbe essere possibile far esprimere geni del differenziamento o dell'apoptosi, che sono epigeneticamente repressi nelle cellule neoplastiche (Jain *et al.*, 2009).

Uno dei meccanismi epigenetici più frequenti riguarda la metilazione del DNA, che consiste nell'aggiunta di un gruppo metilico alla posizione C5 dell'anello pirimidinico della citosina (C) (figura 9a) (Robertson and Wolffe, 2000). Questa reazione avviene solo quando la (C) è seguita da una guanina (G) (che formano i cosiddetti dinucleotidi CpG) ed è mediata da enzimi detti DNA metiltransferasi (DNMTs). Nelle cellule neoplastiche, i promotori di geni oncosoppressori, associati a dinucleotidi CpG, possono essere ipermetilati. Il risultante silenziamento genico

aberrante è funzionalmente simile all'inattivazione dovuta ad alterazioni genomiche, come mutazioni o delezioni (Jones and Baylin, 2007). L'induzione di ipometilazione di un promotore genico, associato a dinucleotidi CpG, potrebbe portare alla ri-espressione del gene silenziato e, perciò, essere di grande importanza clinica. Con il termine "agente demetilante o ipometilante" si indica un composto capace di indurre una transiente ipometilazione del DNA. Attualmente, due agenti ipometilanti sono in uso clinico: la 5-azacitidina e la 5-Aza-2'-deossicitidina (decitabina) (figura 9b) (Jain *et al.*, 2009).

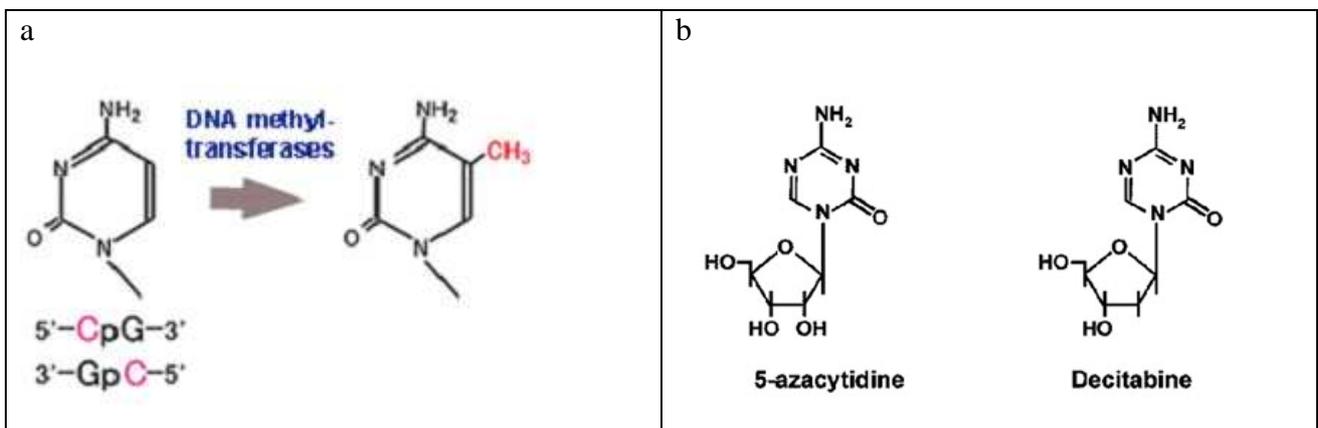


Figura 9. a) Azione della DNA metil-transferasi (vedi testo). b) Struttura degli agenti demetilanti utilizzati in clinica, 5-azacitidina e decitabina.

4. SCOPO DELLO STUDIO

Sebbene la prognosi di bambini ed adolescenti con LAM è significativamente migliorata nei decenni passati, per aumentare il tasso di cura e diminuire la tossicità del trattamento di tale tipo di neoplasia, c'è bisogno di comprendere meglio la biologia dei diversi tipi di LAM e di ricercare nuove ed efficaci strategie terapeutiche.

L'argomento di tesi del mio corso di Dottorato di Ricerca ha riguardato lo studio della leucemia acuta mieloide con traslocazione t(9;11)(p22;q23), utilizzando modelli cellulari umani, in vitro.

I principali obiettivi sono stati:

1) analizzare l'espressione genica di *MLL-AF9* e di alcuni suoi geni target, importanti per la leucemogenesi indotta da tale oncogene, in relazione principalmente al processo di differenziamento monocito-macrofagico.

2) valutare gli effetti di diverse molecole, singole ed in combinazione, a concentrazioni ottenibili in clinica, con l'obiettivo di "sensibilizzare" le cellule leucemiche al differenziamento terminale, lungo il *lineage* monocito-macrofagico.

5. MATERIALI E METODI

5.1. *Colture cellulari e trattamenti sperimentali.*

Le linee cellulari THP-1, MOLM-13 e Mono Mac 6 (MM6) sono state isolate dal sangue periferico di pazienti affetti da LAM-M5; in particolare, le cellule THP-1 derivano da un bambino di un anno di età (Tsuchiya *et al.*, 1980), le MOLM-13 da un paziente maschio di 20 anni (Matsuo *et al.*, 1997) e le MM6 da un paziente maschio di 64 anni (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988). Queste tre linee cellulari sono tutte caratterizzate dalla presenza della traslocazione cromosomica t(9;11)(q21;q23) ed esprimono l'oncogene *MLL-AF9* (Matsuo *et al.*, 1997; Odero *et al.*, 2000; Super *et al.*, 1995). Da notare che la linea cellulare THP-1 presenta un solo trascritto di *MLL-AF9*, mentre le cellule MOLM-13 e MM6 presentano due trascritti di *MLL-AF9*, dovuti a splicing alternativo (Montemurro *et al.*, 2004; Odero *et al.*, 2000; Super *et al.*, 1995). Inoltre, tutte e tre le linee possiedono proprietà morfologiche, funzionali e biochimiche tipiche delle cellule del *lineage* monocitico, con le MM6 che presentano un maggior grado di differenziamento, rispetto alle THP-1 e le MOLM13 (Auwerx, 1991; Matsuo *et al.*, 1997; Tsuchiya *et al.*, 1980; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988). Come linea cellulare che non esprime *MLL-AF9* è stata utilizzata la linea cellulare HL-60, derivata dal sangue periferico di una paziente di 35 anni con LAM-M2 (Collins *et al.*, 1977; Dalton *et al.*, 1988; Gallagher *et al.*, 1979).

Le cellule THP-1, MOLM-13 e HL-60 sono state coltivate in mezzo di coltura costituito da RPMI-1640 (Gibco-BRL, Basel, Switzerland), arricchito con 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco), 1% di L-Glutammmina (Gibco) e 1% di penicillina/streptomina (Gibco). Per le cellule MM6, al mezzo di coltura descritto sopra è stato aggiunto anche l'1% di "OPI MEDIA" (Sigma, St. Louis, MO, USA), costituito da ossalacetato (0.15 g), piruvato (0.05 g) ed insulina bovina (0.0082 g). Tutte le linee cellulari sono state coltivate in fiasche di polistirene "Falcon" T25 o T75 e mantenute in incubatore a 37°C, in presenza di CO₂ al 5%. Per mantenere ed amplificare le cellule in coltura sono state effettuate diluizioni 2-3 volte a settimana: il mezzo veniva sostituito centrifugando le cellule a 1100 rpm per 5 minuti, quindi veniva eliminato il sovrnatante ed aggiunto nuovo terreno preriscaldato a 37°C.

Negli esperimenti effettuati, le linee cellulari sono state trattate con le seguenti molecole:

- PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato; Sigma), sospeso in etanolo alla concentrazione di $1,6 \times 10^{-3}$ e stoccato in aliquote a -20°C ;
- IFN- γ (interferon gamma; Sigma) sospeso in PBS alla concentrazione di 10 U / μl e stoccato in aliquote a -20°C ;
- M-CSF (macrophage colony-stimulating factor; Sigma), sospeso in PBS alla concentrazione di 5 ng / μl e stoccato a in aliquote a -20°C ;
- VD3 (1,25-diidrossivitamina D3; colecalciferolo; calcitriolo, Sigma), sospesa in etanolo alla concentrazione di 5 μM e stoccata in aliquote a -20°C ;
- Decitabina (5-aza-2'-deoxycytidine; 5-AZA; Sigma) sospesa in acqua alla concentrazione di 1 mM e stoccata a stoccata in aliquote a -20°C .

Tutte le molecole sopraelencate sono state diluite in mezzo completo ed aggiunte alle cellule, per ottenere la concentrazione indicata negli esperimenti.

Per inibire selettivamente l'espressione di MLL-AF9 è stato utilizzato un oligonucleotide antisenso fosforotioato (PS-ODN), che permette di ottenere una più efficiente modulazione dell'espressione genica (Spiller et al., 1998), rispetto ad un oligonucleotide non fosforotioato. E' stato progettato un PS-ODN antisenso (PS-ODNs) di 18 paia di basi con sequenza 5' GGTTGTTTCAGACTTTTCT 3' complementare al punto di fusione del trascritto chimerico MLL-AF9. Come controllo negativo è stato progettato un PS-ODN senso (PS-ODNs) con la sequenza: 5' AGAAAAGTCTGAACAACC 3' corrispondente alla stessa regione di interesse. Sono stati usati per la progettazione dei due oligonucleotidi i programmi "Primer" e "Amplify", che hanno permesso di verificare l'assenza di dimeri o di sequenze ripetitive. È stato utilizzato il programma "Blast 227" per verificare il grado di omologia con altre sequenze genomiche. L'oligonucleotide è stato sintetizzato (M-Medical, Milan, Italy) con scala di sintesi 0,2 μM e purificato con HPLC per rimuovere i prodotti di sintesi incompleti.

Per facilitare l'introduzione dell'oligonucleotide all'interno della cellula, si è utilizzata una tossina batterica, prodotta da Streptococcus Pyogenes: la Streptolisina-O (SL-O; Sigma). La soluzione permeabilizzante era costituita da Steptolisina-O, in concentrazione 1000 U/ml, e ditiotreitolo in concentrazione 5 mM, in buffer salino privo di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} . La soluzione era messa in incubazione per 2 h a 37°C e,

successivamente, conservata a -20°C . Per ogni trattamento sono state utilizzate 5×10^5 cell/ml, lavate con Phosphate Buffered Saline (PBS) e risospese in 200 μl di una soluzione contenente mezzo di coltura privo di FBS, 40 U di Streptolisina-O e PS-ODNas 20 μM , come indicato dal protocollo (Giles *et al.*, 1995a; Giles *et al.*, 1995b). Da notare che nel mezzo usato in queste soluzioni non era presente l'FBS, poiché la SL-O viene inattivata dalle proteine sieriche e i PS-ODN possono reagire con tali proteine. È stata utilizzata la concentrazione di 20 μM di PS-ODN, poiché in letteratura risulta che tale concentrazione, in associazione con SL-O, è quella più vantaggiosa per avere un'efficace inibizione dell'mRNA bersaglio (Spiller *et al.*, 1998a; Spiller *et al.*, 1998b; Spiller and Tidd, 1995). Le cellule, risospese nelle varie soluzioni di 200 μl , sono state trasferite in piastre da 24 pozzetti ed incubate a 37°C per 10 minuti. Ad ogni campione è stato quindi aggiunto 1ml di mezzo di coltura completo (con FBS) per inattivare l'azione della SL-O e consentire una rapida risigillatura della membrana cellulare. I campioni sono stati incubati per ulteriori 20 minuti a 37°C e quindi trasferiti in fiasche di coltura contenenti 9 ml del normale mezzo di coltura. I campioni sono stati mantenuti in incubatore a 37°C . Ai tempi prestabiliti sono state effettuate le analisi cellulari e molecolari.

5.2. Analisi cellulare

5.2.1. Valutazione dell'aderenza e della morfologia cellulare.

Le cellule THP-1, MOLM-13 e MM6 crescono come cellule piccole, rotonde e senza aderire alla fiasca di coltura (in sospensione). In seguito a differenziamento terminale monocito-macrofagico, le cellule differenziate aderiscono alla fiasca o piastra di coltura e subiscono anche variazioni morfologiche (emissione di prolungamenti cellulari), visibili mediante microscopia ottica. Quindi, le modificazioni morfologiche delle cellule, dopo i vari trattamenti, sono state evidenziate mediante microfotografie ottenute con un microscopio a contrasto di fase 20X. Anche l'aderenza cellulare alla superficie plastica della fiasca di coltura è stata valutata in modo visivo: le cellule sono state considerate "adese" se resistevano ad una vigorosa agitazione della fiasca di coltura e lavaggio della stessa con mezzo di coltura o PBS.

5.2.2. Valutazione della proliferazione e della vitalità cellulare.

Tale valutazione è stata effettuata mediante la colorazione con “Trypan Blue”. Questo colorante penetra per trasporto passivo in tutte le cellule, ma viene espulso solo da quelle vive. In questo modo è possibile discriminare le cellule vive da quelle morte, che appaiono blu. Le cellule vive sono state contate utilizzando una camera di conta (camera di Burker); il procedimento prevede la preparazione di una mix costituita da 20 µl del colorante “Trypan Blue” e da 20 µl di sospensione cellulare; qualche goccia di questa mix è caricata nella camera di Burker, per effettuare la conta cellulare al microscopio ottico. La quantità totale di cellule presenti viene calcolata utilizzando la formula seguente:

$$\text{N}^\circ \text{ di cellule / ml} = \text{cellule per quadrato} \times 10^4 \times 2 \text{ (fattore di diluizione)}$$

La percentuale di inibizione della proliferazione, rispetto al controllo è stata calcolata nel seguente modo:

- si considera il numero finale delle cellule del controllo, meno le cellule iniziali, come il 100% di incremento della proliferazione;
es. se il numero finale è 1000000 ed il numero di cellule iniziali è 200000
allora il 100% di incremento della proliferazione è:
 $1000000 - 200000 = 800000 = 100\%$
- Si calcola l'incremento del numero di cellule trattate, meno quelle iniziali;
quindi, si calcola la percentuale corrispondente, rispetto al controllo;
es. se il numero finale del trattato è 700000 ed il numero di cellule iniziali è 200000, allora la percentuale corrispondente X, rispetto al controllo è $700000 - 200000 = 500000$
quindi, $800000 : 100\% = 500000 : X\%$ $X = 62,5\%$
- La percentuale di inibizione della proliferazione è la differenza tra la percentuale di incremento della proliferazione del controllo (100%) e quella del trattato; per l'esempio precedente si ha:

$$\text{percentuale inibizione della proliferazione} = 100 - 62,5 = 37,5 \%$$

5.2.3. Valutazione dell'apoptosi.

È stata eseguita con il metodo dell'Annexina-V (coniugata con FITC, fluoresce isothiocyanate), una proteina Ca^{2+} -dipendente che lega i fosfolipidi di membrana, in particolare la fosfatidilserina, che permette di individuare cellule apoptotiche, poichè nelle prime fasi dell'apoptosi vi sono alterazioni della membrana cellulare, con conseguente esposizione verso l'esterno di fosfolipidi di membrana, tra cui anche la fosfatidilserina. Inoltre, per discriminare cellule apoptotiche da quelle necrotiche, che hanno anch'esse tali alterazioni della membrana cellulare, è necessaria l'aggiunta di Ioduro di Propidio, che è in grado di colorare solo il DNA di cellule necrotiche. La preparazione dei campioni ha richiesto la centrifugazione ed il lavaggio di 1×10^5 cellule con PBS. Il pellet di cellule era risospeso in 100 μl di una soluzione di 1ml contenente 20 μl di Annexina-V e 20 μl di Ioduro di Propidio in tampone salino, come indicato dal protocollo fornito dalla ditta fornitrice il kit "Annexin-V-FLUOS Staining" (Roche, Italy, Milan). Le cellule così risospese erano incubate per 10 minuti al buio a 25°C, dopodiché erano aggiunti 500 μl di PBS ed effettuata l'analisi al citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA). I dati sono stati analizzati dal software "Cell Quest".

5.2.4. Valutazione del ciclo cellulare.

In tale analisi è stata valutata la quantità totale di DNA presente nelle cellule, aggiungendo Ioduro di Propidio ed ottenendo, così, informazioni riguardanti la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. Tale valutazione è stata effettuata mediante citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson). Ogni analisi ha richiesto l'utilizzo di circa 1×10^6 cellule, che erano centrifugate e lavate con PBS. Il pellet cellulare era poi risospeso in 1 ml di buffer salino e a questo erano addizionati, goccia a goccia, vortexando, 3 ml di etanolo assoluto freddo. Il tutto è stato lasciato a riposo per 1 h, in modo da fissare le cellule. Successivamente era aggiunto ad ogni campione 1 ml di RNAsi, precedentemente diluita in PBS. Dopo 30 minuti di incubazione al buio, a 37 °C, erano aggiunti ai campioni da analizzare 250 μl di Ioduro di Propidio per 10 minuti. I risultati sono stati analizzati dal software "Mod Fit", da cui si ottiene un grafico con picchi, le cui aree corrispondono alla percentuale di cellule presenti nelle varie fasi del ciclo cellulare.

5.3. Analisi del differenziamento terminale monocito-macrofagico.

Oltre alla valutazione dell'aderenza e della morfologia cellulare, che sono proprietà differenti tra cellule THP-1, MOLM-13 ed MM6 di controllo e dopo induzione del differenziamento terminale monocito-macrofagico, sono state effettuate anche le seguenti valutazioni:

5.3.1. Valutazione dell'espressione di antigeni di superficie.

È stata valutata, mediante analisi citofluorimetrica, l'espressione degli antigeni di superficie CD11b e CD14, la cui espressione aumenta durante il differenziamento monocito-macrofagico. Per ogni campione analizzato, circa 1×10^6 cellule sono state lavate con PBS e risospese in 500 μ l di PBS. Le cellule adese sono state rimosse dal fondo della fiasca mediante incubazione con tripsina 1X per 5 minuti, seguita da leggero scraping. Gli anticorpi monoclonali degli antigeni valutati sono stati acquistati dalla ditta Becton Dickinson: CD11b (clone-D12) e CD14 (clone-M_pP9). Tali anticorpi monoclonali, forniti ad una concentrazione di 1 μ g/5 μ l e coniugati con FITC (fluoresceine isothiocyanate) o R-PE (R-phycoerythrin), sono stati aggiunti alle cellule in un volume di 5 μ l ciascuno per ogni campione. Dopo incubazione al buio e a temperatura ambiente per 15 minuti, le cellule assieme agli anticorpi sono state lavate 2 volte in PBS e risospese nella stessa soluzione salina per l'acquisizione al citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson). L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il software "Cell Quest".

5.3.2. Valutazione della funzionalità enzimatica tramite saggio NBT.

Il test di riduzione del NitroBlu di Tetrazolio (NBT) è un metodo standard di laboratorio per valutare la funzionalità di sistemi enzimatici coinvolti in reazioni di ossidoriduzione. La riduzione dell'NBT avviene all'interno dei granulociti neutrofili e dei monociti differenziati, ad opera di una ossidasi NADH-dipendente; se le cellule differenziano lungo il lineage monocitico-macrofagico, allora esse saranno in grado di aumentare la loro capacità di ridurre l'NBT. Il Nitroblu di Tetrazolio è una sostanza di colore giallo allo stato ossidato che, in seguito a riduzione, assume un

colore blu scuro e precipita all'interno del citoplasma cellulare, dando luogo a granuli scuri visibili al microscopio ottico. Per l'esecuzione di questo test è stata utilizzata la seguente metodica:

- 2×10^5 cellule sono state centrifugate per 5' a 1100 rpm ed il pellet è stato risospeso in 200 μ l di una soluzione contenente 0,1% di NBT polvere e 100 ng/ml di PMA in PBS
- tale sospensione cellulare è stata incubata per 1 h a 37°C
- la reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 3 ml di PBS freddo e le cellule sono state centrifugate a 1100 rpm per 5' e risospese in 200 μ l di PBS
- con questa sospensione cellulare sono stati preparati vetrini al cytospin che sono stati osservati al microscopio ottico

Per le cellule che dopo trattamento aderivano alla fiasca, la metodica è stata modificata in questo modo:

- 2×10^5 cellule sono state seminate in particolari fiasche di coltura (chamberslides), da cui è possibile estrarre il fondo e trattarlo come un vetrino
- Dopo trattamento, ai tempi prestabiliti per effettuare l'analisi, è stato eliminato il sovrnatante, è stato effettuato lavaggio con PBS ed alle cellule sono stati aggiunti 200 μ l della soluzione di NBT sopraccitata
- il tutto è stato incubato a 37°C per 1 h
- sono stati aggiunti 3 ml di PBS freddo per bloccare la reazione ed, eliminato il sovrnatante, è stato estratto il vetrino dalle chamberslides, che è stato osservato al microscopio ottico.

La percentuale di cellule contenente depositi citoplasmatici, sotto forma di granuli blu-neri, è stata determinata su un minimo di 300 cellule per ogni campione.

5.3.3. Valutazione della funzione fagocitica.

Per valutare la capacità di fagocitosi, tipica dei monociti-macrofagi maturi, sono state utilizzate particelle di lattice fluorescinate nel rosso (Sigma). Tali particelle di lattice, con diametro di circa 2 μm , sono state usate come sospensione acquosa al 2,5% ed aggiunte alle cellule in coltura, prima e dopo trattamento, in un rapporto di 20 : 1. Per l'esecuzione di questo test è stata utilizzata la seguente metodica:

- per le cellule in sospensione, ai tempi prestabiliti per effettuare l'analisi, le particelle di lattice sono state aggiunte direttamente nel mezzo di coltura
- la miscela è stata quindi incubata a 37°C per 1 h, dopodiché è stata centrifugata e lavata con PBS, per rimuovere l'eccesso di particelle
- il pellet ottenuto è stato risospeso in 500 μl di PBS, per preparare vetrini al cytospin.
- le cellule fissate sui vetrini sono state osservate al microscopio ottico a fluorescenza (Olympus BX51).

Per quanto riguarda le cellule trattate adese, la metodica è stata modificata in questo modo:

- 2×10^5 cellule sono state seminate nelle fiasche chamberslides e trattate secondo il disegno sperimentale.
- Dopo trattamento, ai tempi prestabiliti per effettuare l'analisi, sono state aggiunte le particelle di lattice, direttamente nel mezzo di coltura
- la miscela è stata quindi incubata a 37°C per 1 h, dopodiché è stato eliminato il sovrantante ed effettuato lavaggio con PBS, per rimuovere l'eccesso di particelle
- infine, è stato estratto il vetrino dalle chamberslides ed i campioni sono stati osservati al microscopio ottico a fluorescenza.

La percentuale di cellule contenente particelle di lattice ingerite, del tutto o parzialmente, è stata determinata su un minimo di 300 cellule per ogni campione.

5.4. *Analisi molecolare*

5.4.1. Estrazione dell'RNA.

L'RNA totale è stato estratto da un numero di cellule compreso tra 8×10^5 e 1×10^6 , utilizzando "RNeasy Mini Kit (50)" (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) seguendo le istruzioni della ditta fornitrice del kit:

- le cellule in sospensione sono state centrifugate e lavate in PBS; il pellet è stato poi risospeso in 350 μ l del buffer di lisi (costituito da β -mercaptoetanololo e buffer RLT in proporzione 1:100);
- per le cellule adese alla fiasca, invece, è stato eliminato il mezzo di coltura e sono stati aggiunti 350 μ l di buffer di lisi;
- in entrambi i casi al lisato sono stati aggiunti 350 μ l di etanolo al 70%
- i 700 μ l totali di tale miscela sono stati trasferiti in una RNeasy mini column e centrifugati per 15 secondi a 10000 rpm;
- l'RNA recuperato sulla resina della colonna è stato sottoposto a 3 lavaggi successivi, rispettivamente con 700 μ l di buffer RW1 e 500 μ l di buffer RPE per 2 volte (tutte le centrifugazioni sono state effettuate a 10000 rpm);
- dopo aver trasferito la colonna contenente l'RNA in una provetta eppendorf da 1,5 ml, sono stati aggiunti direttamente nella resina della colonna 30 μ l di Rnase-free e si è centrifugato per 1 minuto a 10000 rpm, per fare eluire l'RNA dalla colonna alla eppendorf; questa operazione viene ripetuta 2 volte.

La quantità totale di RNA recuperato è stata poi valutata tramite lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 260 nm.

5.4.2. Retrotrascrizione dell'RNA estratto a cDNA.

Per la reazione di retrotrascrizione (RT), 1 μ g di RNA totale, era pre-trattato con "RNase-free DNase", riscaldato a 70°C per 10 min, posto in ghiaccio per 1 min e retrotrascritto mediante incubazione per 1 h a 42°C con una miscela contenente 0.5 mM dNTPs mix, 25 ng/ μ l oligo(dT)15-18 (Life Technologies Italia, Milan, Italy), 10 mM ditiotreitolo, 1X "first-strand buffer", 10 unità di inibitore di RNasi

(Amersham Biotech, Milan, Italy), 200 unità di SuperScript RT (Life Technologies) e acqua per un volume finale di 20 µl. La reazione era fermata mediante riscaldamento a 70°C per 15 min. I filamenti doppi di RNA-DNA sono stati trattati con 5 unità di RNasi H (US Biochemicals, Cleveland, OH, USA) a 37°C per 20 min e la quantità di cDNA a singolo filamento è stata valutata mediante fluorometria (Victor2 1420 Multilabel Counter, Wallac), con la sonda fluorescente Oligreen (Life Technologies), usando il fago M13+ come DNA a singolo filamento standard.

5.4.3. PCR semi-quantitativa Real Time.

Per la PCR semi-quantitativa Real Time (35 cicli), il cDNA era amplificato con 2X Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies), insieme ai primers, forward e reverse (5 pmol ciascuno), riportati in tabella 5. Ciascun primer era progettato in base alle sequenze conosciute riportate in GenBank, utilizzando il programma “Primer 3” (Rozen and Skaletsky, 2000). La reazione di PCR era eseguita mediante Rotor Gene 3000 a 36 pozzetti (Corbett Research, Rotor-Gene™ 3000, version 5.0.60, Mortlake, Australia). Ciascun ciclo consisteva di una fase di denaturazione a 95 °C per 15 s, seguita da una fase annealing (30 s) ed una fase di estensione (30 s, 72 °C). La fluorescenza era monitorata alla fine di ciascuna fase di estensione. Un controllo senza cDNA era incluso in ciascun esperimento. Alla fine dei cicli di amplificazione è stata aggiunta un’analisi della curva di melting. L’analisi della temperatura di melting rivelava un profilo caratteristico del prodotto di amplificazione, evidenziando alla temperatura attesa un picco stretto tipico dell’amplicone ottenuto. La specificità del prodotto era determinata dalla generazione di una curva di melting e mediante elettroforesi degli ampliconi. I campioni sono stati amplificati in duplicato ed il valore medio dei “crossing point (CP)” è stato usato per i calcoli successivi (Larionov *et al.*, 2005). L’analisi dei dati è stata fatta secondo il “Metodo della Curva Standard Relativa” (Bustin, 2000). Il valore relativo dell’espressione del gene di interesse, normalizzato rispetto a quello della GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), era espresso da un numero che indicava l’espressione relativa rispetto a tale gene.

Tabella 5. Primers impiegati per la PCR semi-quantitativa Real Time.

GenBank AC	cDNA	sense Primer	antisense Primer	Product size (bp)
NM_002046	GAPDH	CAACGGATTTGGTCGTATTG	GGAAGATGGTGATGGGATTT	209
NM_002141	HOXA4	ACCCGTTCCCTCCTCCATATAATC	GCAACCAGCACAGACTCTTAACC	200
NM_019102	HOXA5	ACGGCTACGGCTACAATGGC	CCCTCTGCTGCTGATGTGG	292
NM_024014	HOXA6	TACACCTCACCTTGTTTCTACC	CGCCTTCGTCATGGAGTG	229
NM_006896	HOXA7	AAATGGGGTTTGGTGAAATCTG	CCGCTTCTGTGAGTTGG	221
NM_152739	HOXA9	TACCACCACCATCACCAC	CACAAGCATAGTCAGTCAGG	232
NM_018951	HOXA10	GCAAAGAGTGGTCGGAAGAAG	CGTCGCCTGGAGATTCATC	254
NM_005523	HOXA11	TGGTCCCTGCTCCTCTAAC	GGCTCAATGGCGTACTCTC	189
NM_002398	MEIS1	AGTGAGCAAGGTGATGGC	CTCGGTTGGACTGGTCTATC	289
NM_004529	MLL-AF9	AGCACTGGTCATCCCGCCTCAG	TCGGCTGCCTCCTCTATTACAG	382
NM_005375	MYB	GATGAATCTGGAATTGTTGCTGAG	GGCGAGGTCTGCGTGAAC	164

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1. *Espressione di MLL-AF9 e suoi geni target durante la maturazione monocito-macrofagica in linee cellulari di LAM-M5 con traslocazione t(9;11)(p22;q23).*

6.1.1. Espressione di *MLL-AF9* e *MYC*.

Capire quali processi cellulari vengono disregolati dall'espressione di un determinato gene di fusione di *MLL* è di grande importanza, per cercare di individuare nuove molecole e nuove strategie terapeutiche, per la cura delle leucemie 11q23/*MLL*.

Per quanto riguarda l'oncogene *MLL-AF9*, è stato riportato che, sia in modelli murini che in quelli aviari, la sua espressione causa un'iniziale espansione non maligna di cellule progenitrici mieloidi; in seguito, si ha lo sviluppo di cellule leucemiche, di fenotipo principalmente mieloidi, proprio come avviene negli esseri umani. Questi risultati indicano che l'espressione di *MLL-AF9* altera la normale proliferazione dei precursori mieloidi (Corral *et al.*, 1996; Dobson *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003; Schulte *et al.*, 2002). Infatti, è stato successivamente dimostrato che l'espressione di diversi oncogeni di *MLL*, tra cui *MLL-AF9* ed *MLL-ENL*, è in grado di indurre il processo di immortalizzazione in cellule progenitrici mieloidi, che normalmente non hanno tale capacità di auto-rinnovamento, presente invece nelle cellule staminali emopoietiche (Lavau *et al.*, 1997; Muntean *et al.*, 2008). Per quanto riguarda il processo di apoptosi cellulare e quello del blocco del differenziamento terminale, esistono dati contrastanti. È stato riportato che le proteine di fusione *MLL-AF9*, *MLL-ENL* ed *MLL-ELL* possono impedire l'apoptosi indotta da *GADD34* (Adler *et al.*, 1999). Inoltre, l'espressione di *MLL-AF9* nelle cellule mielomonocitiche 32D può bloccare il differenziamento granulocitico indotto da *G-CSF* (Joh *et al.*, 1999). Tuttavia, è stato riportato anche che l'espressione di *MLL-AF9* nelle cellule promonocitiche U937 induce il differenziamento monocito-macrofagico terminale ed infine morte cellulare (Caslini *et al.*, 2000).

Un modo alternativo di investigare la funzione di un (onco)gene è di utilizzare una strategia “knockout”, in cellule che spontaneamente esprimono tale (onco)gene. A questo proposito, abbiamo analizzato la funzione di *MLL-AF9* inibendone, selettivamente, la sua espressione mediante un oligonucleotide antisenso fosforotioato (*MLL-AF9-PS-ODNas*), nelle cellule THP-1. Da questi studi, effettuati prima di iniziare il periodo del dottorato di ricerca, è risultato che il trattamento con *MLL-AF9-PS-ODNas* induceva, nelle cellule THP-1, una forte inibizione della crescita cellulare; in particolare si otteneva una forte riduzione della proliferazione cellulare ed un moderato aumento dell’apoptosi. Questi dati sono stati confermati anche in altri studi simili, riportati da altri autori (Kawagoe *et al.*, 2001). Per quanto riguarda gli effetti sul differenziamento terminale, il trattamento con *MLL-AF9-PS-ODNas* non induceva nessuno “sblocco” e le cellule non presentavano nessun segno di maturazione terminale. Questi risultati hanno confermato che *MLL-AF9* è un forte fattore proliferativo; tuttavia, essi hanno anche indicato che *MLL-AF9* può essere solo un moderato fattore anti-apoptotico e non può essere responsabile del blocco del differenziamento mielomonocitico terminale, presente nelle cellule THP-1. Quindi altre mutazioni leucemogenetiche devono essere presenti, le quali insieme all’espressione di *MLL-AF9* inducono la piena trasformazione leucemica di cellule progenitrici emopoietiche. Sempre nello stesso lavoro, abbiamo rilevato che l’espressione di *MLL-AF9* era down-regolata in seguito a differenziamento terminale monocito-macrofagico, nelle cellule THP-1. Questi risultati sono stati pubblicati nel seguente lavoro:

- Pession A, Martino V, Tonelli R, Beltramini C, Locatelli F, Biserni G, Franzoni M, Freccero F, Montemurro L, Pattacini L, Paolucci G. ***MLL-AF9* oncogene expression affects cell growth but not terminal differentiation and is downregulated during monocyte-macrophage maturation in AML-M5 THP-1 cells.** *Oncogene.* 2003 Nov 27;22(54):8671-6.

Il risultato che l’espressione di *MLL-AF9* fosse down-regolata dopo differenziamento terminale monocito-macrofagico, nelle cellule THP-1, ci ha portato ad analizzare, in seguito, se tale fenomeno si verificasse anche in altre linee cellulari con traslocazione t(9;11)(p22;q23). I dati ottenuti, utilizzando le linee cellulari THP-1, MOLM-13 ed MM6, hanno indicato che la down-regolazione di *MLL-AF9* non era necessaria per indurre il differenziamento monocito-macrofagico terminale. Abbiamo

anche rilevato che la down-regolazione di *MLL* wild-type non era necessaria per ottenere tale differenziamento terminale. Infine, abbiamo analizzato l'espressione del proto-oncogene *MYC*, la cui attività trascrizionale risulta di molto aumentata dalla presenza di oncoproteine come MLL-AF9. Anche per *MYC*, abbiamo rilevato che la sua down-regolazione non era necessaria per ottenere il differenziamento monocito-macrofagico terminale, nelle linee cellulari analizzate. Questi risultati sono illustrati nella figura 10 e sono stati pubblicati nel seguente lavoro:

- Martino V, Tonelli R, Montemurro L, Franzoni M, Marino F, Fazzina R, Pession A. **Down-regulation of MLL-AF9, MLL and MYC expression is not obligatory for monocyte-macrophage maturation in AML-M5 cell lines carrying t(9;11)(p22;q23).** *Oncol Rep.* 2006 Jan;15(1):207-11.

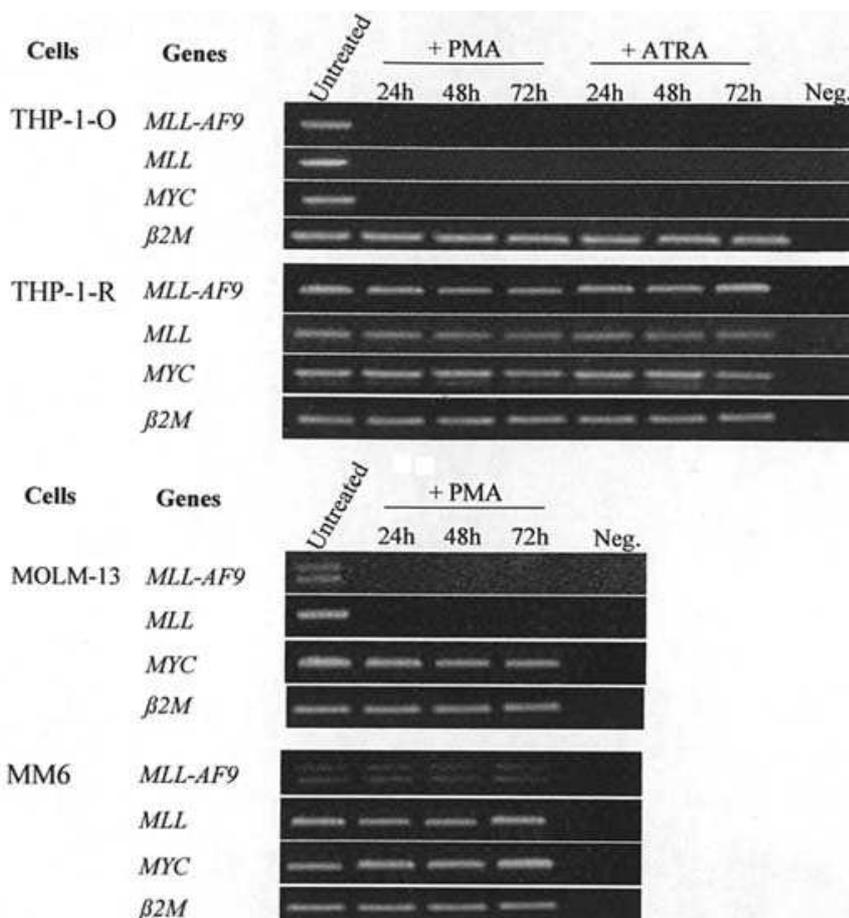


Figura 10. Analisi dell'espressione di *MLL-AF9*, *MLL* e *MYC*, mediante RT-PCR, in linee cellulari di LAM-M5 con traslocazione t(9;11)(p22;q23), non trattate e differenziate lungo il *lineage* monocito-macrofagico. THP-1-O ('original type' di cellule THP-1), THP-1-R ('rapid-growing type' di cellule THP-1). In tutte le linee cellulari esaminate, il gene housekeeping, β -2M (β -2 microglobulin), era costantemente espresso allo stesso livello (Martino *et al.*, 2006).

A questo punto abbiamo deciso di verificare l'espressione di altri geni coinvolti nel processo di leucemogenesi indotta da *MLL-AF9*, durante la maturazione terminale. In questa parte del lavoro di tesi, abbiamo analizzato l'espressione dei geni *HOXA4*, *5*, *6*, *7*, *9*, *10*, *11*, *MEIS1*, e *MYB*, nella linea cellulare THP-1, durante l'induzione del differenziamento terminale monocito-macrofagico. Da notare che il gene *HOXA8* è assente nei vertebrati.

6.1.2. Espressione dei geni *HOXA* e *MEIS1*

Analisi di espressione genica hanno rivelato che l'espressione di *Mll-AF9* in cellule di midollo osseo murine induce una iper-espressione di diversi geni, tra cui *Hoxa4*, *5*, *6*, *7*, *9*, *10* e *11* (definiti come geni 'Hoxa-code') e *Meis1*, un cofattore delle proteine Hox (Krivtsov *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2004; Somervaille and Cleary, 2006). Perciò, una cooperazione tra l'espressione di *Mll-AF9*, 'Hoxa-code' e *Meis1* sembra necessaria per l'induzione della leucemogenesi in progenitori ematopoietici murini (Chen *et al.*, 2008b; Krivtsov *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2004). I geni *HOX* ed i loro cofattori sono principalmente espressi nelle cellule staminali ematopoietiche (HSCs) e nei progenitori ematopoietici immaturi e sono down-regolati durante il differenziamento terminale (Kawagoe *et al.*, 1999). La iper-espressione di questi geni è frequentemente associata con la trasformazione leucemogenetica dei progenitori ematopoietici. Una funzione ipotizzata per i geni *HOX* ed i loro cofattori è quella di regolare i meccanismi di auto-rinnovamento nelle HSCs, cosicché la deregolata espressione di tali geni sembra essere un evento cruciale per lo sviluppo di cellule staminali leucemiche (Argiropoulos and Humphries, 2007; Argiropoulos *et al.*, 2007; Eklund, 2007; Wong *et al.*, 2007).

Abbiamo deciso, quindi, di valutare l'espressione di *HOXA4*, *5*, *6*, *7*, *9*, *10*, *11* e *MEIS1*, mediante PCR semi-quantitativa Real Time, durante il differenziamento monocito-macrofagico indotto dal PMA, in cellule THP-1. Per discriminare tra l'espressione di *MLL-AF9* e l'espressione dei geni indotti dall'espressione di *MLL-AF9*, abbiamo eseguito tutte le analisi di PCR in cellule THP-1 che esprimevano *MLL-AF9*, anche dopo il differenziamento terminale indotto dal PMA. La figura 11 mostra che non vi è nessuna differenza significativa nell'espressione di *MLL-AF9* tra le cellule THP-1 di controllo e quelle trattate con PMA per 72 h.

La figura 12 mostra l'espressione dei geni *HOXA*-code, che erano tutti espressi nelle cellule THP-1 non trattate. L'espressione dei geni *HOXA* 4, 7, 10 e 11 era down-regolata, dopo differenziamento indotto dal PMA. In particolare, la down-regolazione maggiore era osservata per *HOXA11* (91% del controllo), seguita da *HOXA7* e 4 (53 e 52% del controllo, rispettivamente) e *HOXA10* (45% del controllo). Poiché questi geni down-regolati sono indotti dall'espressione di *MLL-AF9* (Krivtsov et al., 2006; Kumar et al., 2004; Somervaille and Cleary, 2006), in futuro, bisognerebbe analizzare l'espressione dell'oncoproteina MLL-AF9, in cellule THP-1 differenziate, per valutarne una possibile down-regolazione a livello post-trascrizionale. Riguardo all'espressione degli altri geni *HOX*, abbiamo rilevato che *HOXA6* era l'unico gene *HOXA* la cui espressione era up-regolata (più di due volte, rispetto al controllo). Ad oggi, poco è stato riportato sulla funzione di *HOXA6*. In un recente studio, *HOXA6* era trovato iper-metilato, principalmente in neoplasie linfoidi, suggerendo che alcuni membri della famiglia dei geni *HOX* possano essere bersaglio di inattivazione genica e, forse, avere ruoli di soppressori nello sviluppo delle neoplasie ematologiche (Strathdee et al., 2007). Infine, la differenza di espressione dei geni *HOXA5* e *HOXA9* non era statisticamente significativa tra le cellule THP-1 di controllo e trattate. Riguardo alla proteina HOXA9, è stato riportato che essa è fosforilata dalla protein chinasi C (PKC), un processo potenziato dal PMA, un noto attivatore della PKC e l'induttore del differenziamento impiegato in questo studio. Tale fosforilazione indebolisce l'abilità di legame di HOXA9 al DNA ed induce il differenziamento mieloide (Vijapurkar et al., 2004).

La figura 13 mostra i risultati dell'espressione del gene *MEIS1*, che era espresso nelle cellule THP-1 di controllo ed era down-regolato nelle cellule THP-1 differenziate con PMA (72% rispetto al controllo).

Nell'insieme quest'analisi indica che la maggior parte dei geni dell'*HOXA*-code e *MEIS1* possano essere down-regolati (trascrizionalmente o post-trascrizionalmente per *HOXA9*), durante il differenziamento terminale monocito-macrofagico, suggerendo un ruolo per questi geni nel processo di blocco del differenziamento, oltre a quello giocato nei processi di auto-rinnovamento, in leucemie relative a *MLL-AF9* (Argiropoulos and Humphries, 2007; Argiropoulos et al., 2007; Wong et al., 2007). Inoltre, questo studio supporta la teoria che, per la leucemogenesi indotta da *MLL-AF9*, l'espressione di un singolo gene *HOXA* non è sufficiente. Invece, è richiesta l'espressione di diversi geni dell'*HOXA*-code e loro cofattori, come *MEIS1* (Kumar et al., 2004).

Questi risultati sono stati pubblicati nel seguente lavoro:

- Martino V, Bianchera A, Reia L, Bussolati O, Fazzina R, Marino F, Montemurro L, Tonelli R, Pession A, Gazzola GC, Sala R. **Down-regulation of *HOXA4*, *HOXA7*, *HOXA10*, *HOXA11* and *MEIS1* during monocyte-macrophage differentiation in THP-1 cells.** *Molecular Medicine Reports* 2: 241-244, 2009.

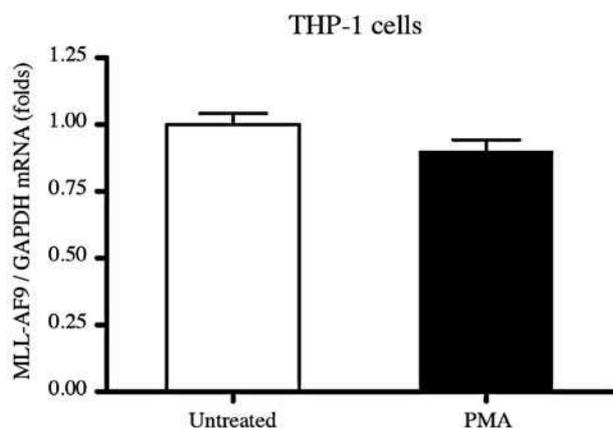


Figura 11. Espressione di *MLL-AF9* in cellule THP-1 non trattate e trattate con PMA per 72 h. I valori rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

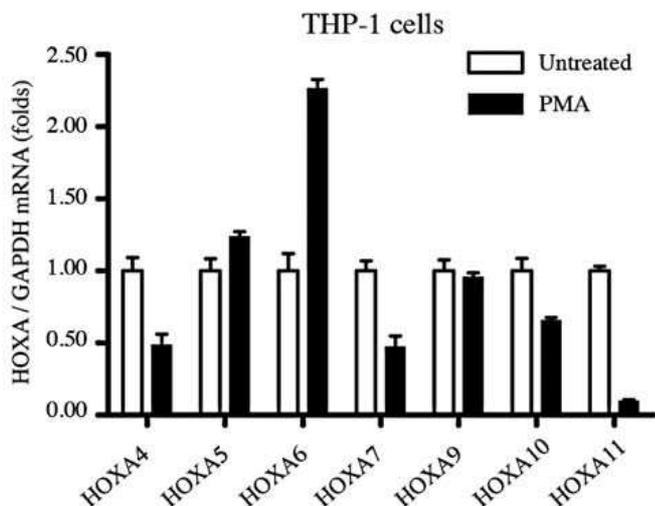


Figura 12. Espressione dell'*HOXA*-code in cellule THP-1 non trattate e trattate con PMA per 72 h. I valori rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

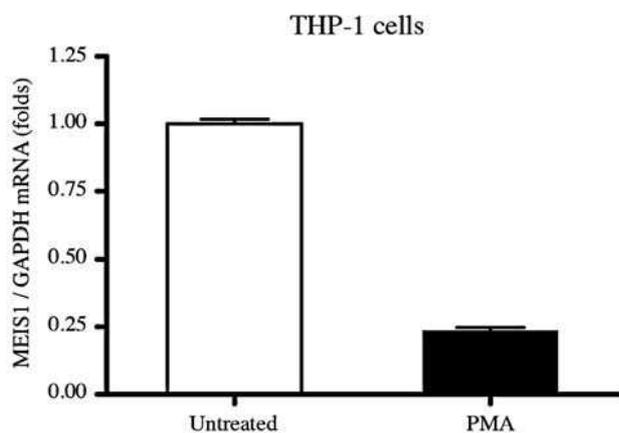


Figura 13. Espressione di *MEIS1* in cellule THP-1 non trattate e trattate con PMA per 72 h. I valori rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

6.1.3. Espressione di *MYB*, in cellule THP-1.

Dopo aver dimostrato che, durante il differenziamento terminale monocito-macrofagico in cellule THP-1, avviene la down-regolazione dell'espressione della maggior parte dei geni dell'*HOXA*-code e di *MEIS1*, abbiamo pensato di analizzare l'espressione del proto-oncogene *MYB*, l'omologo cellulare dell'oncogene *v-myb* (Greig *et al.*, 2008; Ramsay and Gonda, 2008). I livelli di *MYB* sono elevati in molte leucemie e *Myb* ha una funzione critica nello sviluppo della cellula staminale emopoietica, come evidenziato da difetti ematopoietici in animali con deficienza di *Myb* (Emambokus *et al.*, 2003; Mucenski *et al.*, 1991). È stato riportato che, in cellule ematopoietiche primarie, *Myb* era tra i geni che mostravano la più pronunciata up-regolazione, in risposta alla iper-espressione di *Hoxa9* e *Meis1*, indotti dalla oncoproteina MLL-ENL (Hess *et al.*, 2006). Nello stesso lavoro viene anche riportato che l'espressione ectopica di *Myb* induceva un blocco del differenziamento terminale, ma *Myb* da solo non era capace di trasformazione cellulare come avviene, invece, con l'espressione di *Hoxa9/Meis1*. Questi risultati suggeriscono che *Myb* è essenziale, ma non sufficiente, per la trasformazione mediata da *Hoxa9/Meis1* (Hess *et al.*, 2006).

Per valutare se l'espressione di *MYB* potesse variare in seguito a differenziamento terminale, abbiamo analizzato la sua espressione in cellule THP-1, prima e dopo induzione del differenziamento terminale con PMA. La figura 14 mostra i risultati del "time course" dell'espressione del gene *MYB*, che era espresso nelle cellule THP-1 di controllo e, praticamente, non era più espresso nelle cellule THP-1 differenziate con PMA. La down-regolazione di *MYB* era del 99%, rispetto al controllo, già dopo 24h, e l'espressione di *MYB* si manteneva agli stessi livelli fino a 96h.

Questi dati supportano l'idea che *MYB* possa essere un trasmettitore cruciale di segnali oncogenici da parte del pathway *HOXA/MEIS1* e di regolatori a monte di tale pathway (come le oncoproteine di MLL); in particolare, *MYB* potrebbe essere cruciale nel favorire la proliferazione cellulare ed inibire l'induzione del differenziamento terminale monocito-macrofagico (Hess *et al.*, 2006).

Attualmente, stiamo effettuando valutazioni dell'espressione di *MYB*, prima e dopo differenziamento terminale monocito-macrofagico, in altre linee cellulari di leucemia mieloide acuta, con traslocazione t(9;11)(p22;q23) e che esprimono *MLL-AF9*; l'obiettivo è quello di analizzare se il risultato della down-regolazione di *MYB*,

ottenuto nelle cellule THP-1, si verifichi anche in altre linee cellulari leucemiche con simili caratteristiche, per individuare delle caratteristiche anormali comuni di espressione genica, in tale tipo di patologia.

Time course MYB in cellule THP-1

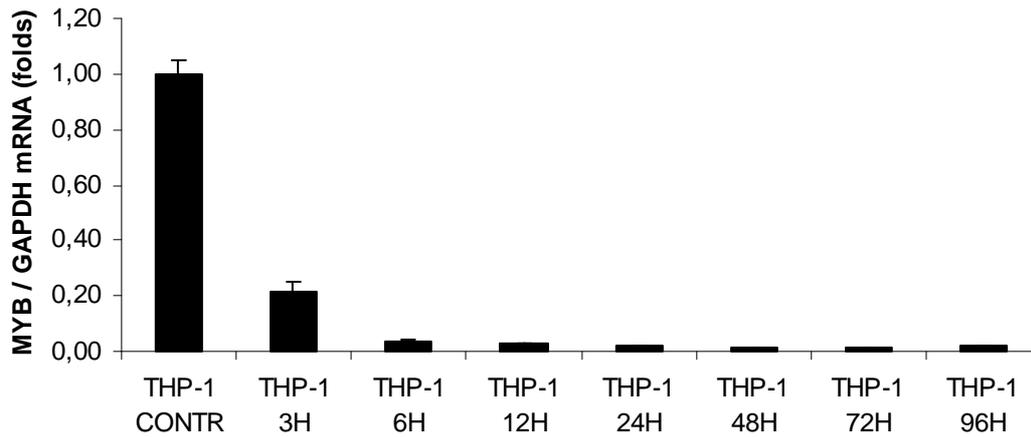


Figura 14. Time course dell'espressione di *MYB* in cellule THP-1 di controllo e differenziate con PMA. I valori rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

6.2. Analisi sull'induzione del differenziamento terminale monocito-macrofagico in linee cellulari di LAM-M5 con traslocazione t(9;11)(p22;q23).

6.2.1. Effetti del PMA a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23)

Recentemente, l'estere del forbolo 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), anche conosciuto comunemente come phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), è stato oggetto di alcuni studi clinici di fase I-II, in pazienti oncologici (Fang *et al.*, 2007; Han *et al.*, 1998a; Han *et al.*, 1998b; Schaar *et al.*, 2006; Strair *et al.*, 2002). Tali studi sono stati intrapresi poiché, in analisi precliniche, il PMA ha mostrato la capacità di indurre il differenziamento terminale e/o apoptosi in molte linee cellulari e blasti leucemici derivati da pazienti (Abrahm *et al.*, 1986; Koeffler *et al.*, 1981; Lotem and Sachs, 1979; Polliack *et al.*, 1982; Shkolnik *et al.*, 1985). Nei pazienti, quando il PMA è somministrato endovena, la massima dose tollerata è 0,125 mg/m². Le concentrazioni ematiche di PMA a tale dosaggio, misurate in due differenti studi clinici, sono illustrate nella tabella 6.

Concentrazioni ematiche di PMA alla dose somministrata di 0.125 mg/m ²			Ref
Immediatamente dopo - fine somministrazione	1h dopo - fine somministrazione	3h dopo - fine somministrazione	
1,66 ± 0,20 ng/ml - 2,7 nM	0,62 ± 0,16 ng/ml - 1 nM	0,28 ± 0,05 ng/ml - 0,5 nM	(Schaar <i>et al.</i> , 2006)
1,75 ± 0,55 ng/ml - 2,8 nM	0,93 ± 0,54 ng/ml - 1,5 nM	0,69 ± 0,42 ng/ml - 1,1 nM	(Cui <i>et al.</i> , 2002)

Tabella 6. Concentrazioni del livello di PMA nel sangue. Ciascun valore rappresenta la media di diverse rilevazioni ± le deviazioni standard.

Anche nelle cellule leucemiche con traslocazione t(9;11)(q21;q23), è possibile indurre il differenziamento terminale monocito-macrofagico mediante trattamento con PMA. In particolare, le cellule THP-1 possono essere indotte a differenziare mediante trattamento con PMA, alla concentrazione di 20 nM; per le cellule MM6, è possibile far differenziare il 50% di tali cellule utilizzando il PMA alla concentrazione di 80 nM. In seguito ad induzione del differenziamento terminale

monocito-macrofagico, le cellule THP-1 e MM6 smettono di proliferare, diventano aderenti alla superficie plastica della fiasca di coltura, presentano molte caratteristiche funzionali ed antigeniche del *lineage* monocito-macrofagico ed emettono prolungamenti cellulari, assumendo una morfologia simile a quella dei macrofagi (Tsuchiya *et al.*, 1982; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994).

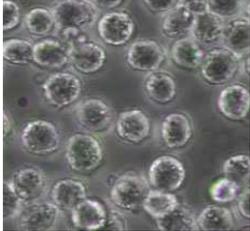
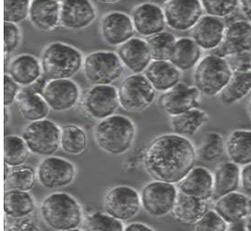
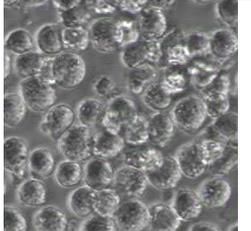
Come si può osservare dalla tabella 6, le concentrazioni non tossiche di PMA che si possono ottenere nel sangue dei pazienti (< 3 nM) sono inferiori a quelle normalmente usate in laboratorio per differenziare linee cellulari leucemiche con traslocazione t(9;11)(q21;q23), come le THP-1 e le MM6. Poiché non esistono in letteratura lavori che riportano eventuali effetti del PMA, a concentrazioni clinicamente ottenibili, in linee cellulari con traslocazione t(9;11)(q21;q23), abbiamo pensato di valutare gli effetti del PMA, a concentrazioni cliniche, in tali cellule leucemiche. Nella linea cellulare THP-1, abbiamo effettuato un esperimento pilota, per valutare gli effetti del PMA alla concentrazione di 1 nM. Poiché risultavano esserci importanti effetti anche a tale concentrazione, abbiamo deciso di analizzare gli effetti di concentrazioni scalari di PMA, da 0,05 a 2 nM. In particolare, abbiamo valutato gli effetti sulla proliferazione, sull'aderenza e sulla morfologia delle cellule THP-1, nonché specifiche caratteristiche del differenziamento monocito-macrofagico, come la capacità di fagocitosi e di riduzione dell'NBT e l'espressione dei markers superficiali CD11b e CD14. I dati ottenuti per questa valutazione sono riportati nella tabella 7 e nei grafici in figura 15.

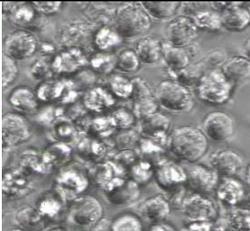
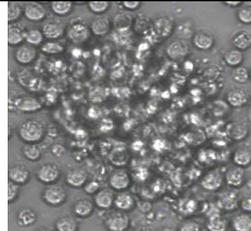
Come si vede dalla tabella 7, le cellule THP-1 di controllo presentano una morfologia rotondeggiante, non vi è aderenza alla superficie plastica ed esprimono alcune caratteristiche del *lineage* monocitico. Alla concentrazione di 0,05 e 0,1 nM, il PMA induce solo una lieve inibizione della proliferazione cellulare. Alla concentrazione di 0,3 nM, il PMA induce, oltre ad un'inibizione del 30% della proliferazione, anche una parziale aderenza delle cellule, sia alla superficie plastica che tra le cellule stesse (adesione omotipica); inoltre vi è anche un lieve incremento delle caratteristiche monocitarie analizzate. Alla concentrazione di 0,5 nM, il PMA induce una forte inibizione (80%) della proliferazione; un'altra caratteristica peculiare è la presenza di enormi aggregati cellulari omotipici, oltre che aderenza delle cellule alla superficie plastica, indicando l'acquisizione di forti capacità adesive, da parte delle cellule; anche i valori delle caratteristiche monocitarie analizzate continuano ad aumentare. Alla concentrazione di 0,7 nM di PMA si nota una minore adesione omotipica, con aggregati cellulari di dimensioni notevolmente minori

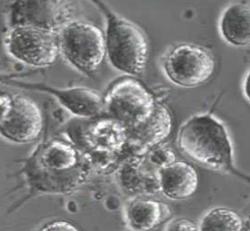
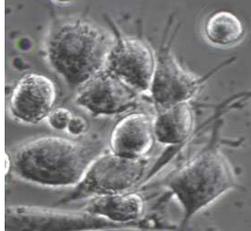
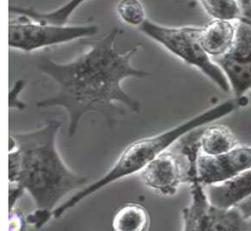
rispetto alla concentrazione di 0,5 nM; inoltre, molte cellule iniziano ad emettere prolungamenti cellulari. Alla concentrazione di 1 nM di PMA si ha un'inibizione della proliferazione pari a circa il 90% e quasi tutte le cellule aderiscono alla superficie plastica, con poca adesione omotipica; inoltre, sempre più cellule emettono prolungamenti cellulari e le caratteristiche monocitarie analizzate sono notevolmente aumentate rispetto al controllo. Tali effetti si riscontrano, con lievi incrementi, anche alla concentrazione di 2 nM di PMA. Il trattamento con PMA alla concentrazione di 20 nM induce, come atteso, un'inibizione quasi completa della proliferazione e le cellule sono fortemente aderenti alla superficie plastica, senza adesione omotipica, con prolungamenti cellulari molto accentuati. Inoltre, le caratteristiche funzionali ed antigeniche del lineage monocito-macrofagico sono fortemente espresse.

In conclusione, quest'analisi indica che, nelle cellule THP-1, il PMA è in grado di indurre inibizione della proliferazione ed espressione di caratteristiche tipiche del differenziamento terminale monocito-macrofagico anche a concentrazioni clinicamente ottenibili (1 e 2 nM). Tali caratteristiche sono ulteriormente accentuate quando il PMA è utilizzato alla concentrazione di 20 nM, ovvero la concentrazione di PMA comunemente utilizzata in laboratorio per differenziare le cellule THP-1.

Tabella 7. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con dosi scalari di PMA.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)		
	Controllo	PMA 0,05 nM	PMA 0,1 nM
Morfologia			
Aderenza	non presente	non presente	non presente
Numero cell/ml inibizione proliferazione	1080000 0 %	940000 16 %	870000 24 %
NBT	42.4 ± 3.1 %	43.6 ± 2.8 %	46.1 ± 2.9 %
Fagocitosi	4.1 ± 0.3 %	5.8 ± 0.2 %	8.8 ± 0.4 %
CD 11b	8.5 ± 1.2 %	11.8 ± 1.2 %	15.2 ± 1.4 %
CD 14	3.6 ± 0.4 %	4.1 ± 0.2 %	4.2 ± 0.3 %

	PMA 0,3 nM	PMA 0,5 nM	PMA 0,7 nM
Morfologia			
Aderenza	Parziale (fiasca - omotipica)	Presente (fiasca - omotipica)	Presente (fiasca - omotipica)
Numero cell/ml inibizione proliferazione	810000 31 %	370000 81 %	330000 85 %
NBT	56.8 ± 2.4 %	65.8 ± 2.1 %	68.8 ± 2.8 %
Fagocitosi	16.3 ± 0.6 %	27.9 ± 0.7 %	35.9 ± 1.7 %
CD 11b	25.5 ± 1.1 %	36.7 ± 2.2 %	41.9 ± 2.7 %
CD 14	5.1 ± 0.5 %	6.3 ± 0.8 %	8.8 ± 0.6 %

	PMA 1 nM	PMA 2 nM	PMA 20 nM
Morfologia			
Aderenza	presente (fiasca)	presente (fiasca)	presente (fiasca)
Numero cell/ml inibizione proliferazione	300000 89 %	280000 91 %	230000 96 %
NBT	73.1 ± 3.5 %	78.1 ± 3.3 %	95.8 ± 3.3 %
Fagocitosi	46.3 ± 2.6 %	52.3 ± 2.9 %	85.1 ± 3.4 %
CD 11b	45.5 ± 3.3 %	59.4 ± 3.6 %	81.5 ± 3.2 %
CD 14	13.3 ± 1.3 %	18.1 ± 1.7 %	25.1 ± 2.4 %

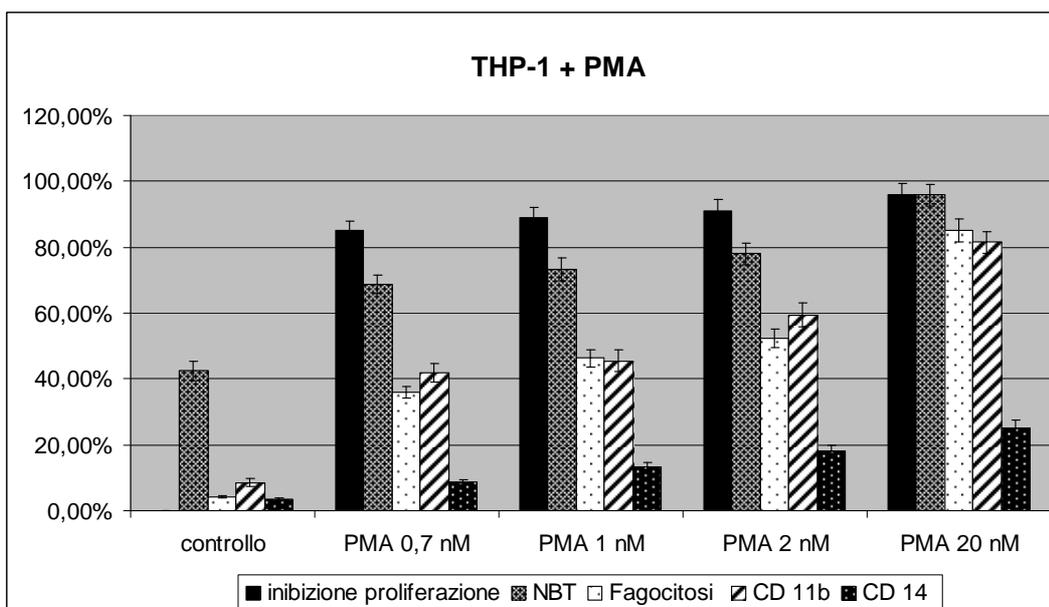
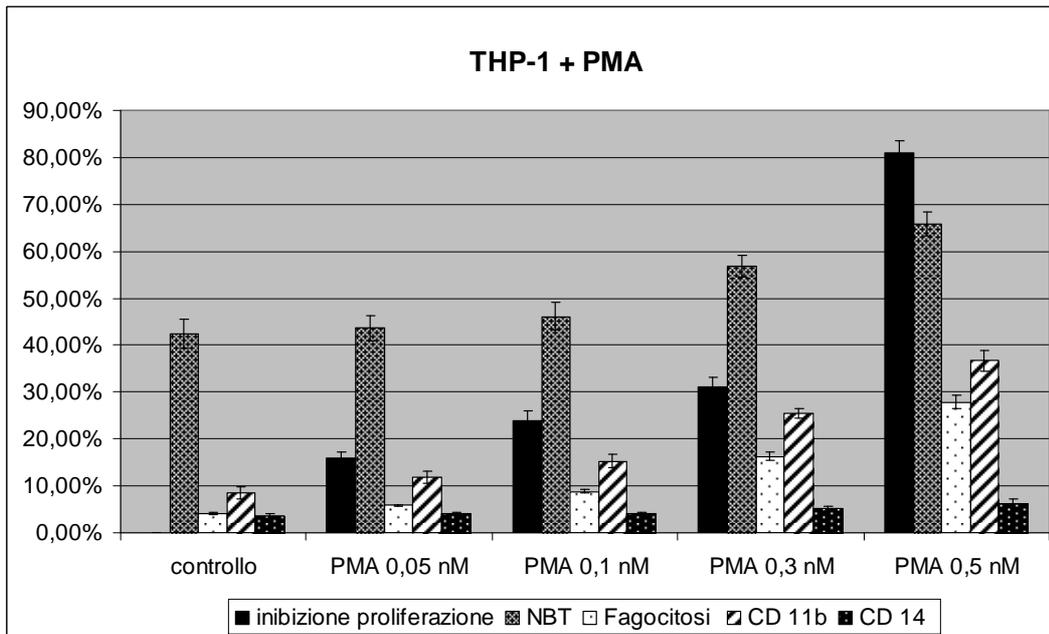
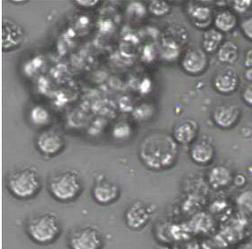
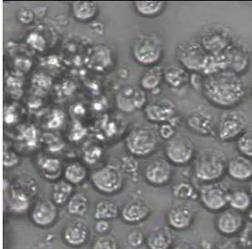
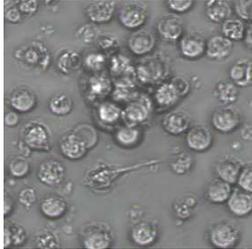


Figura 15. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 7, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di tre esperimenti separati.

Per quanto riguarda le cellule MM6, abbiamo detto che il PMA alla concentrazione di 80 nM è in grado di indurre il differenziamento monocito-macrofagico solo nel 50% di tali cellule. Quindi, è improbabile che concentrazioni cliniche di PMA (< 3 nM) possano indurre effetti rilevanti nelle cellule MM6. Infatti, abbiamo provato a trattare le cellule MM6 con il PMA alla concentrazione di 2 nM e, dopo 72h, non c'erano differenze rilevanti con le cellule di controllo. I dati ottenuti per questa valutazione sono riportati nella tabella 8 e nel grafico di figura 16.

Come si vede dalla tabella 8, le cellule MM6 presentano una morfologia rotondeggiante senza aderenza alla superficie plastica; tuttavia, sono presenti aggregati cellulari che indicano presenza di adesione omotopica. Inoltre, anche le caratteristiche funzionali ed antigeniche monocito-macrofagiche sono più accentuate rispetto alle cellule THP-1. Infatti, le cellule MM6 presentano un grado di differenziazione maggiore lungo il *lineage* monocito-macrofagico (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988). Il trattamento con PMA alla concentrazione di 2 nM non induce, in pratica, variazioni di rilievo rispetto alle cellule di controllo. Come atteso, alla concentrazione di 80 nM il PMA induce circa il 50% delle cellule a smettere di proliferare ed aderire alla superficie plastica; inoltre, alcune cellule iniziano ad emettere prolungamenti e le caratteristiche funzionali ed antigeniche monocito-macrofagiche risultano aumentate, rispetto al controllo.

Tabella 8. Risultati del trattamento di cellule MM6 con PMA a 2 e 80 nM. A quest'ultima dose, le analisi sono state effettuate solo sulle cellule adese, eliminando le cellule in sospensione.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)		
	Controllo	PMA 2 nM	PMA 80 nM
Morfologia			
Aderenza	non presente	non presente	presente (~ 50% cellule)
Numero cell/ml	630000	610000	390000
inibizione proliferazione	0	5	56
NBT	56.4 ± 3.7 %	58.6 ± 2.8 %	72.6 ± 3.5 %
Fagocitosi	22.6 ± 2.3 %	25.8 ± 2.2 %	49.1 ± 3.4 %
CD 11b	25.3 % ± 2,1	26.8 ± 2.4 %	45.3 % ± 3.2
CD 14	53.5 % ± 2,1	54.0 ± 2.8 %	58.3 % ± 2,9

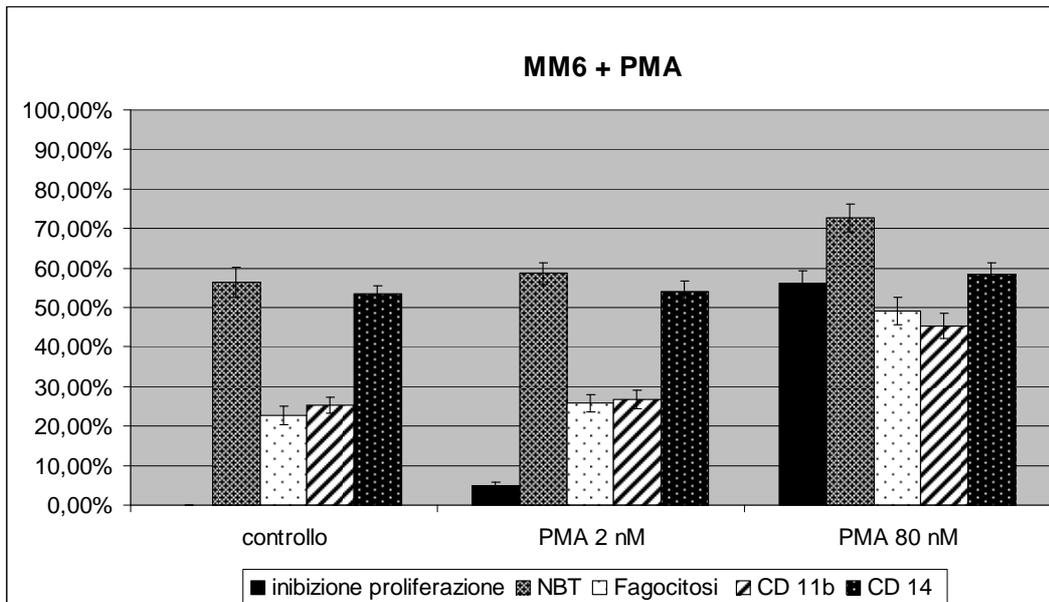


Figura 16. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule MM6. I valori, elencati in tabella 8, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

Nel complesso, questi risultati indicano che il PMA potrebbe essere utile, come agente differenziante in vivo (a concentrazioni cliniche), solo in alcuni casi di LAM-M5 con traslocazione t(9;11)(q21;q23), ma non in tutti (come dimostrato con le cellule MM6). Inoltre, se il PMA fosse in grado di indurre il differenziamento monocitico terminale in cellule leucemiche, allora bisognerebbe considerare la possibilità di formazione di grandi aggregati di cellule leucemiche (induzione di aderenza omotipica). Il fenomeno dell'adesione di cellule leucemiche tra loro è stato riportato in casi di LAM con iper-leucocitosi e può essere indotto dall'ATRA (All-Trans Retinoic Acid), nella terapia della leucemia acuta promielocitica, come parte della sindrome da acido retinoico (McKee and Collins, 1974; Vahdat *et al.*, 1994). La formazione di grandi aggregati leucocitari può provocare leucostasi all'interno dei capillari sanguigni, dove la circolazione viene ostruita creando, così, formazioni trombotiche e compromettendo il funzionamento di vari organi, come il fegato, il cervello e i polmoni. Tali complicazioni, potenzialmente fatali, sono in relazione proprio con le alterazioni adesive delle cellule leucemiche (Larson *et al.*, 1997).

6.2.2. Effetti dell'IFN- γ a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23)

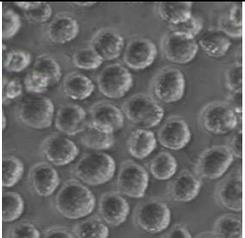
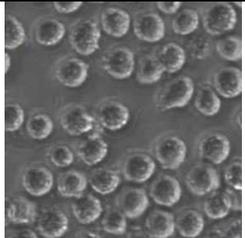
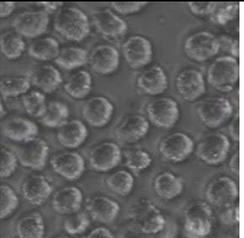
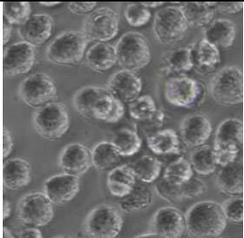
È stato riportato che l'interferon-gamma (IFN- γ) induce il differenziamento monocitico, *in vitro*, di cellule blastiche da pazienti con leucemie acute mieloide e sindromi mielodisplastiche (Carlo Stella *et al.*, 1988). Anche le linee cellulari con traslocazione t(9;11)(q21;q23) sono responsive al trattamento con IFN- γ . In particolare, l'IFN- γ riesce ad indurre od aumentare caratteristiche monocito-macrofagiche nelle linee cellulari MM6 e MOLM-13 (Matsuo *et al.*, 1997; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988); invece, nelle cellule THP-1, l'IFN- γ induce un'inibizione della proliferazione, senza evidenti segni di maturazione terminale monocito-macrofagica (Kimball *et al.*, 1995; Mehta and Lopez-Berestein, 1986). Per ottenere tali effetti, *in vitro*, bisogna trattare le cellule con IFN- γ alla concentrazione di 1000 U/ml. Studi clinici di fase I hanno mostrato che, alla massima dose tollerabile di IFN- γ ricombinante, la concentrazione ematica di tale farmaco è di 20-40 U/ml (Lane *et al.*, 1989; Stone *et al.*, 1993). Quindi, anche per l'IFN- γ , come per il PMA, le concentrazioni clinicamente ottenibili sono molto inferiori a quelle comunemente utilizzate, per indurre il differenziamento terminale monocito-macrofagico, in studi di laboratorio.

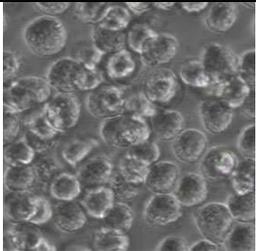
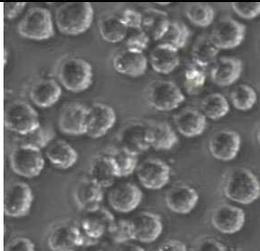
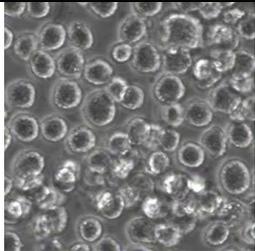
Anche per l'IFN- γ , abbiamo deciso di valutare gli effetti, a concentrazioni clinicamente ottenibili, nella linea cellulare THP-1. In particolare, abbiamo analizzato gli effetti sulla proliferazione, sull'aderenza e sulla morfologia delle cellule THP-1, nonché su specifiche caratteristiche del differenziamento monocito-macrofagico, come la capacità di fagocitosi e di riduzione dell'NBT e l'espressione dei markers superficiali CD11b e CD14. I dati ottenuti per questa valutazione sono riportati nella tabella 9 e nei grafici in figura 17.

Come si vede dalla tabella 9, l'IFN- γ induce già alla concentrazione di 20 U/ml circa il 50% di inibizione della proliferazione cellulare e tale inibizione aumenta con la concentrazione di IFN- γ (a 1000 U/ml si ha oltre il 90% di inibizione della proliferazione). Per quanto riguarda l'aderenza cellulare, essa non è presente fino alla concentrazione di 100 U/ml. Le cellule trattate con 500 U/ml mostrano una debole aderenza; infatti era sufficiente agitare la fiasca di coltura o effettuare lavaggio della stessa con mezzo di coltura o PBS per staccare le cellule dalla superficie plastica. Il trattamento con IFN- γ alla concentrazione di 1000 U/ml induceva circa il 30% di aderenza alla fiasca di coltura, con formazione di piccoli aggregati omotipici. Per quanto riguarda le caratteristiche monocitiche analizzate (NBT, fagocitosi, CD11b e

CD14), l'IFN- γ non induceva variazioni di rilievo fino alla concentrazione di 100 U/ml. Alle concentrazioni di 500 e 1000 U/ml, l'IFN- γ induceva solo un aumento di rilievo nell'espressione del CD11b, rispetto al controllo. In conclusione, quest'analisi indica che l'IFN- γ , a concentrazioni clinicamente ottenibili (≤ 40 U/ml), induceva solo un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare, senza indurre o aumentare caratteristiche delle cellule monocito-macrofagiche mature. Anche a concentrazione di 1000 U/ml, l'effetto principale dell'IFN- γ riguardava l'inibizione della proliferazione, che risultava essere di oltre il 90% rispetto al controllo.

Tabella 9. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con dosi scalari di IFN- γ .

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	IFN- γ 10 U/ml	IFN- γ 20 U/ml	IFN- γ 40 U/ml
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	non presente	non presente
Numero cell/ml inibiz proliferaz	1040000 0 %	900000 17 %	650000 46 %	530000 61 %
NBT	42.4 \pm 3.1 %	41.5 \pm 2.5 %	42.5 \pm 2.8 %	43.0 \pm 3.3 %
Fagocitosi	4.1 \pm 0.3 %	4.0 \pm 0.3 %	4.5 \pm 0.4 %	4.7 \pm 0.3 %
CD 11b	8.5 \pm 1.2 %	7.8 \pm 0.9 %	8.1 \pm 1.1 %	8.9 \pm 1.5 %
CD 14	3.6 \pm 0.4 %	3.9 \pm 0.5 %	3.7 \pm 0.7 %	4.2 \pm 0.3 %

	IFN- γ 100 U/ml	IFN- γ 500 U/ml	IFN- γ 1000 U/ml	
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	Parziale (~ 30%)	
Numero cell/ml inibiz proliferaz	400000 76 %	360000 81 %	280000 91 %	
NBT	46.6 \pm 3.3 %	49.1 \pm 3.1 %	53.5 \pm 2.5 %	
Fagocitosi	6.2 \pm 0.2 %	8.9 \pm 0.4 %	11.5 \pm 2.1 %	
CD 11b	13.8 \pm 1.6 %	21.9 \pm 2.2 %	36.2 \pm 3.1 %	
CD 14	6.0 \pm 0.5 %	9.5 \pm 0.8%	13.7 \pm 1.3 %	

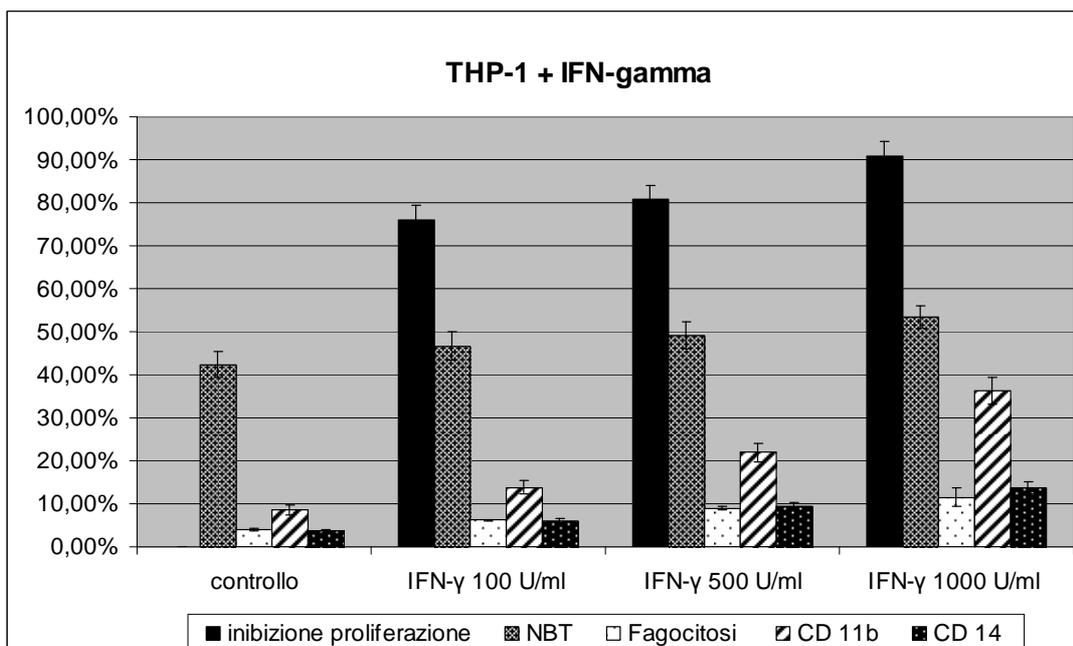
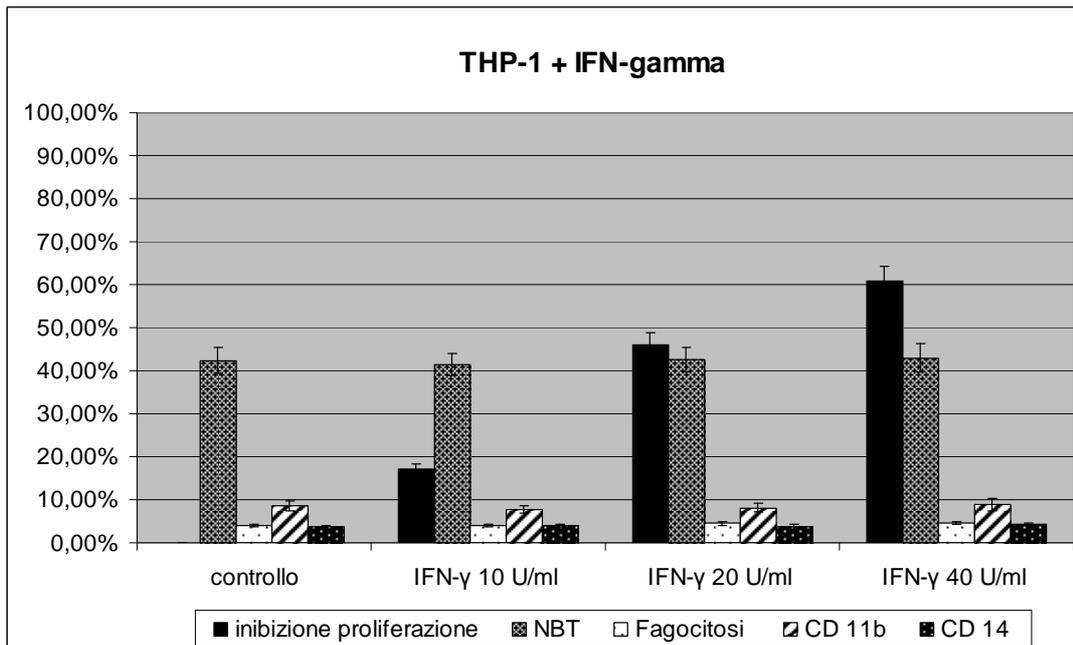


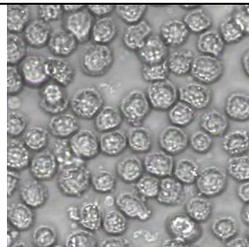
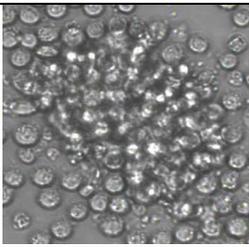
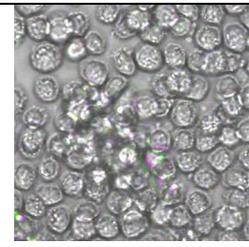
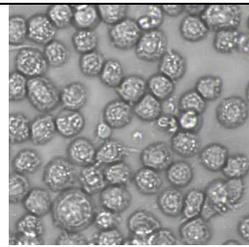
Figura 17. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 9, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di tre esperimenti separati.

6.2.3. Effetti della combinazione PMA + IFN- γ a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23)

Come detto precedentemente, nei pazienti, le concentrazioni ematiche massime che si possono ottenere per il PMA e l'IFN- γ ricombinante sono, approssimativamente, 1 nM e 40 U/ml, rispettivamente (Cui *et al.*, 2002; Lane *et al.*, 1989; Schaar *et al.*, 2006; Stone *et al.*, 1993). Abbiamo pensato di valutare gli effetti della combinazione PMA + IFN- γ , a concentrazioni clinicamente ottenibili, in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23). Abbiamo effettuato tale valutazioni, inizialmente, nelle cellule THP-1 ed abbiamo scelto due combinazioni di PMA + IFN- γ , in cui il PMA è stato utilizzato alla concentrazione di 0,5 nM (cioè, metà della sua concentrazione massima clinicamente ottenibile); per l'IFN- γ sono state utilizzate 2 concentrazioni: 10 e 20 U/ml. I dati ottenuti per questa valutazione sono riportati nella tabella 10 e nel grafico in figura 18.

Come si vede dalla tabella 10, entrambe le combinazioni di PMA e IFN- γ inducevano, come effetto più rilevante, la scomparsa degli enormi aggregati omotipici, che si ottengono trattando le cellule THP-1 solo con il PMA alla concentrazione di 0,5 nM. Inoltre, la combinazione PMA + IFN- γ , con IFN- γ a 20 U/ml, induceva anche in alcune cellule la formazione di prolungamenti cellulari. Le altre caratteristiche analizzate non subivano variazioni rilevanti rispetto al trattamento con PMA singolo a 0,5 nM.

Tabella 10. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con combinazioni PMA + IFN- γ .

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	PMA 0,5 nM	PMA 0,5 nM + IFN- γ 10 U/ml	PMA 0,5 nM + IFN- γ 20 U/ml
Morfologia				
Aderenza	non presente	Presente (fiasca - omotipica)	Presente (fiasca)	Presente (fiasca)
Numero cell/ml	990000	340000	310000	270000
inibiz proliferaz	0 %	82 %	86 %	91 %
NBT	42.4 \pm 3.1 %	65.8 \pm 2.1 %	68.5 \pm 2.3 %	73.2 \pm 3.2 %
Fagocitosi	4.1 \pm 0.3 %	27.9 \pm 0.7 %	29.8 \pm 1.4 %	35.2 \pm 1.2 %
CD 11b	8.5 \pm 1.2 %	36.7 \pm 2.2 %	39.9 \pm 2.7 %	43.1 \pm 3.1 %
CD 14	3.6 \pm 0.4 %	6.3 \pm 0.8 %	8.1 \pm 0.8 %	9.3 \pm 0.5 %

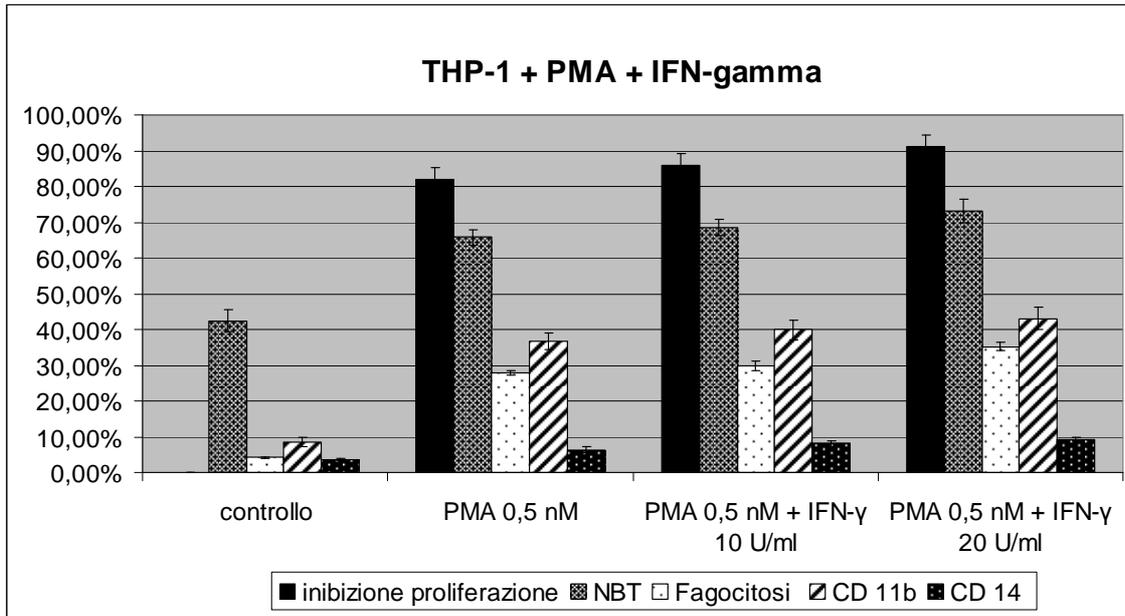
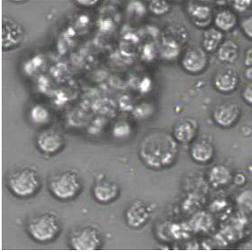
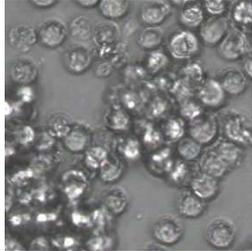


Figura 18. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 10, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di tre esperimenti separati.

La combinazione PMA + IFN- γ , con IFN- γ a 20, è stata provata anche sulle cellule MM6. Come si vede dalla tabella 11 e dal grafico in figura 19, tale combinazione non induceva nessuna variazione, rispetto alle cellule di controllo.

Tabella 11. Dati ottenuti dopo trattamento con la combinazione PMA (0,5 nM) + IFN- γ (20 U/ml), nelle cellule MM6.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)		
	Controllo	PMA + IFN- γ	
Morfologia			
Aderenza	non presente	non presente	
Numero cell/ml	630000	610000	
inibizione proliferazione	0	5 %	
NBT	56.4 \pm 3.7 %	55.8 \pm 3.9 %	
Fagocitosi	22.6 \pm 2.3 %	24.2 \pm 2.6 %	
CD 11b	25.3 % \pm 2,1	26.1 % \pm 2,4	
CD 14	73.5 % \pm 3,1	72.7 % \pm 3,8	

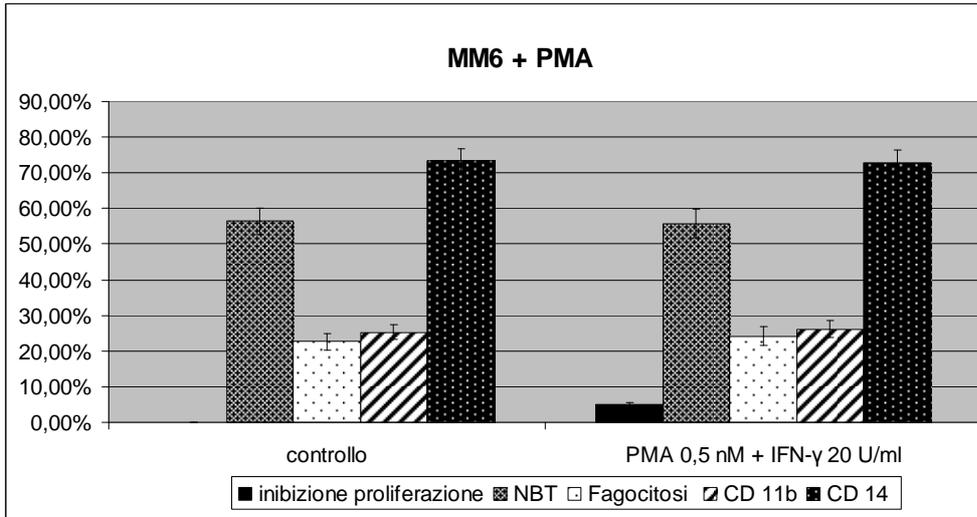


Figura 19. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule MM6. I valori, elencati in tabella 11, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

In conclusione, l'analisi effettuata utilizzando combinazioni di PMA e IFN- γ , a concentrazioni clinicamente ottenibili, ha indicato che le cellule THP-1 risultano responsive ed, inoltre, non si formano i grandi aggregati omotipici, presenti invece dopo trattamento con PMA singolo a 0,5 nM. Le cellule MM6, invece, non subiscono variazioni rilevanti in seguito a tale trattamento, indicando, anche in questo caso, che solo alcuni tipi di cellule leucemiche con traslocazione t(9;11)(q21;q23) potrebbero essere responsive, ad un'eventuale terapia di combinazione con PMA e IFN- γ , a concentrazioni cliniche.

6.2.4. L'inibizione della proliferazione cellulare non è sufficiente per ripristinare il differenziamento terminale indotto dall'M-CSF, in cellule THP-.

Il “fattore stimolante le colonie monocito-macrofagiche”, M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), anche conosciuto come CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1) stimola, nell'ematopoiesi, il differenziamento dei normali progenitori mielomonocitici, lungo il lineage monocito-macrofagico (Bender *et al.*, 2004; Douglass *et al.*, 2008; Mufson, 1990; Pixley and Stanley, 2004). La funzione dell'M-CSF è mediata attraverso il suo specifico recettore superficiale, M-CSFR (o CSF-1R), codificato dal proto-oncogene *FMS*, ed espresso nei monociti e macrofagi maturi e nei loro precursori (Bonifer and Hume, 2008; Xie *et al.*, 2001).

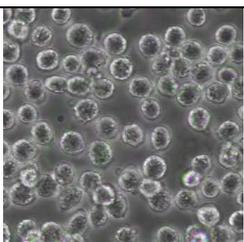
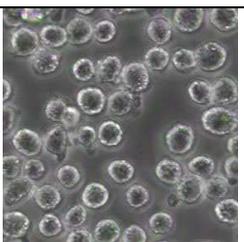
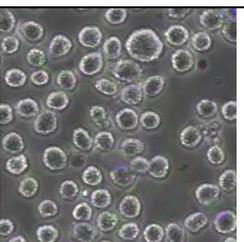
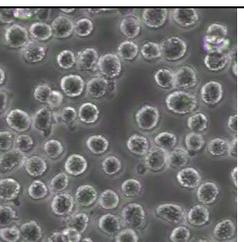
Molte cellule leucemiche isolate da pazienti o cresciute *in vitro* sono insensibili all'azione dell'M-CSF, semplicemente perché il proto-oncogene *FMS* non è espresso. Anche le cellule THP-1 sono insensibili all'azione dell'M-CSF (Brach *et al.*, 1990). Tuttavia, è stato dimostrato che, nelle cellule THP-1, il recettore M-CSFR è espresso, sia a livello di mRNA, che come proteina sulla membrana cellulare; inoltre, tale recettore non è mutato ed è risultato essere funzionale, in quanto il trattamento di cellule THP-1 con l'M-CSF è associato con l'aumentata attività della PKC e l'induzione dell'espressione del gene per il fattore di necrosi tumorale (Datta *et al.*, 1992). Quindi, poiché non vi sono alterazioni del recettore M-CSFR, ma il ligando M-CSF non induce il differenziamento terminale monocito-macrofagico, allora deve esserci un meccanismo che “blocca” il pathway differenziativo indotto dall'M-CSF, rendendo così le cellule THP-1 “resistenti” alla maturazione terminale fisiologica, lungo il *lineage* monocitico. Riuscire a “sbloccare” tale pathway di differenziamento terminale potrebbe essere di grande utilità clinica, in quanto l'M-CSF umano, in forma ricombinante (rh-M-CSF; Mirimostim), è un farmaco, già analizzato in studi clinici di fase I-II, in pazienti oncologici (Cole *et al.*, 1994; Hidaka *et al.*, 2003; Redman *et al.*, 1992; Sanda *et al.*, 1992).

È stato riportato che il trattamento delle cellule THP-1 con IFN- γ , alla concentrazione di 1000 U/ml, è in grado di ripristinare la sensibilità di tali cellule al differenziamento terminale monocito-macrofagico, indotto dall'M-CSF (Kimball *et al.*, 1995). Per le valutazioni della combinazione M-CSF + IFN- γ , abbiamo scelto per l'M-CSF una concentrazione di 30 ng/ml, perché tale concentrazione è quella rilevata in neonati sani (Ikeno *et al.*, 1996; Oren *et al.*, 2001) ed è più elevata di quella rilevata in adulti sani, che è di circa 10 ng/ml (Hanamura *et al.*, 1988; Ikeno *et al.*,

1996); è da ricordare che le leucemie con traslocazioni t(9;11)(p22;q23) hanno un'elevata frequenza nei bambini con meno di 12 mesi di età. Inoltre, l'M-CSF alla concentrazione di 30 ng/ml è in grado di indurre risposte biologiche in cellule normali del *lineage* monocito (Bender *et al.*, 2004; Mufson, 1990). Infine, da studi di fase I la concentrazione ematica di M-CSF di 30 ng/ml è ampiamente al di sotto di quella ottenuta dopo somministrazione di rh-M-CSF, alla dose massima tollerata (Cole *et al.*, 1994; Redman *et al.*, 1992; Sanda *et al.*, 1992).

Prima di tutto, abbiamo valutato gli effetti dell'M-CSF singolo, sulla proliferazione, sull'aderenza e sulla morfologia delle cellule THP-1, nonché su specifiche caratteristiche del differenziamento monocito-macrofagico, come la capacità di fagocitosi e di riduzione dell'NBT e l'espressione dei markers superficiali CD11b e CD14. La tabella 12 ed il grafico in figura 20 mostrano i risultati ottenuti e, come atteso, non si registravano effetti rilevanti dopo trattamento con M-CSF, anche a dosi di 3000 ng/ml.

Tabella 12. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con dosi scalari di M-CSF.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	M-CSF 30 ng/ml	M-CSF 300 ng/ml	M-CSF 3000 ng/ml
		Concentraz fisiologica (sangue) - neonati sani	Concentrazioni farmacologiche - (sangue)	
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	non presente	non presente
Numero cell/ml inizial proliferaz	1050000 0	980000 8	1000000 6	960000 10
NBT	42.4 ± 3.1 %	40.6 ± 3.9 %	43.1 ± 3.5 %	45.1 ± 3.8 %
Fagocitosi	4.1 ± 0.3 %	5.4 ± 0.5 %	5.9 ± 0.4 %	6.2 ± 0.4 %
CD 11b	8.5 ± 1.2 %	10.2 ± 1.5 %	11.1 ± 1.8 %	13.1 ± 1.5 %
CD 14	3.6 ± 0.4 %	4.2 ± 0.6 %	4.8 ± 0.5%	5.5 ± 0.8%

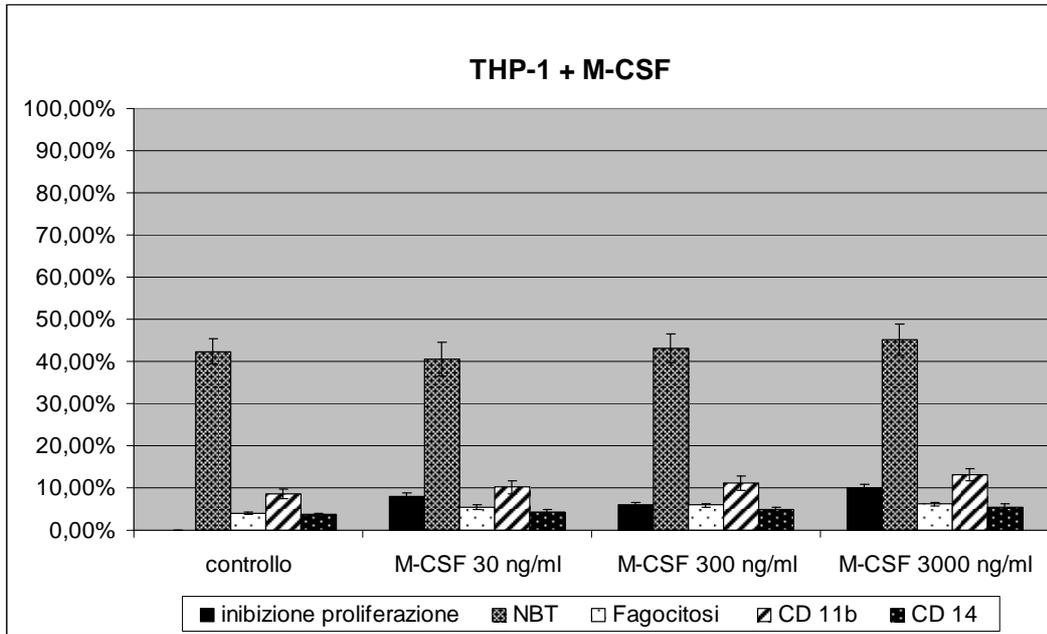
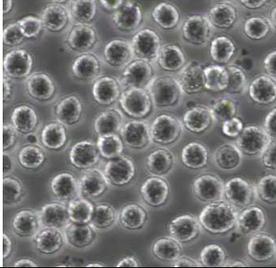
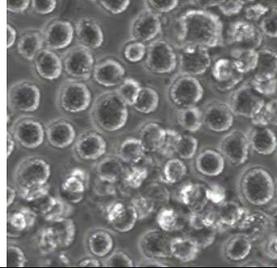
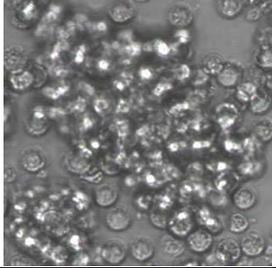


Figura 20. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l’inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l’NBT e di fagocitosi e l’espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 12, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

Gli effetti della combinazione M-CSF (30 ng/ml) + IFN- γ (1000 U/ml), nelle cellule THP-1, sono mostrati nella tabella 13 e nel grafico in figura 21. Come si vede dalla tabella 13, si conferma che le cellule cresciute con IFN- γ (1000 U/ml) mostrano una forte inibizione della proliferazione (85%, rispetto al controllo) ed aderenza alla superficie plastica in circa il 30% dei casi; inoltre, si formano solo sporadici aggregati omotipici di piccole dimensioni. Per quanto riguarda le caratteristiche monocitarie analizzate, risulta aumentata in modo significativo solo l’espressione del CD11b; invece, l’espressione del CD14 e la capacità di ridurre l’NBT e di fagocitosi sono aumentate in modo molto modesto, rispetto al controllo.

Le cellule trattate con la combinazione IFN- γ (1000 U/ml) + M-CSF (30 ng/ml) presentano un’inibizione ancora maggiore della proliferazione (94%, rispetto al controllo), con formazione di grandi aggregati omotipici ed aderenza quasi completa alla superficie plastica. Oltre all’espressione del CD11b, anche la capacità di ridurre l’NBT e di fagocitosi risulta aumentata, rispetto al controllo. Invece, l’espressione del CD14, sebbene aumentata, risulta sempre molto modesta (circa il 15%).

Tabella 13. Effetti dopo trattamento con la combinazione IFN- γ (1000 U/ml) + M-CSF (30 ng/ml), nelle cellule THP-1.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)		
	Controllo	IFN- γ	IFN- γ + M-CSF
Morfologia			
Aderenza	non presente	Parziale (~ 30%)	presente
Numero cell/ml	980000	300000	250000
inibizione proliferazione	0 %	85	94
NBT	42.4 \pm 2.1 %	50.5 \pm 2.5 %	66.7 \pm 3.8 %
Fagocitosi	4.1 \pm 0.3 %	13.1 \pm 1.6 %	42.9 \pm 2.4 %
CD 11b	8.5 \pm 1.2 %	35.1 \pm 1.9 %	69.2 \pm 3.1 %
CD 14	3.6 \pm 0.4 %	10.4 \pm 0.6 %	16.7 \pm 0.9 %

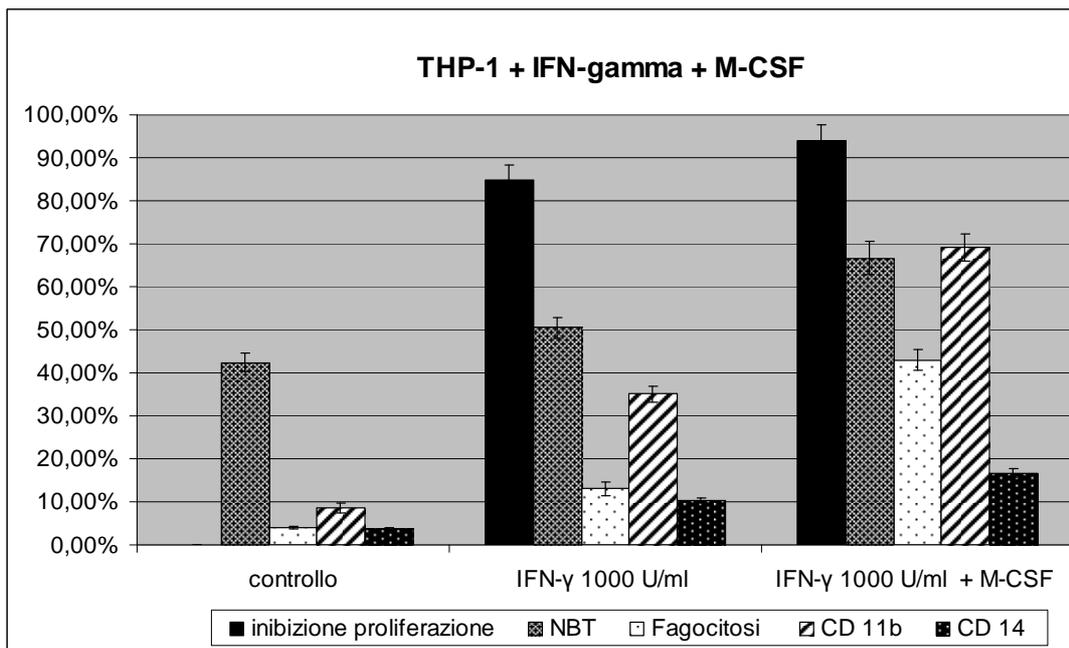


Figura 21. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 13, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di tre esperimenti separati.

In conclusione, quest'analisi mette in evidenza e conferma che, nelle cellule THP-1:

- il trattamento con M-CSF singolo, a qualsiasi concentrazione, non produce alcun effetto differenziativo di rilievo
- il trattamento con IFN- γ (1000 U/ml) induce inibizione della proliferazione e qualche lieve effetto differenziativo, come una parziale induzione delle capacità adesive ed aumento dell'espressione del marker differenziativo CD11b; tuttavia, in generale, gli effetti differenziativi sono piuttosto modesti.
- il trattamento con IFN- γ (1000 U/ml) + M-CSF (30 ng/ml) induce sia inibizione della proliferazione (oltre 90%, rispetto al controllo) sia aumento o comparsa di molte caratteristiche differenziative. Tale combinazione conferma l'ipotesi che il pathway differenziativo indotto dall'M-CSF non è mutato o perso, ma è bloccato, nelle cellule THP-1.

Dai dati appena illustrati risulta che l'IFN- γ si comporta da “sensibilizzatore” al differenziamento terminale monocitico indotto dall'M-CSF, in cellule THP-1. Poiché il principale effetto dell'IFN- γ è una forte inibizione della proliferazione cellulare, ci siamo chiesti se tale caratteristica potesse essere sufficiente per “sensibilizzare” le cellule THP-1 all'effetto differenziativo dell'M-CSF.

Come detto, abbiamo riportato che, nelle cellule THP-1, l'inibizione selettiva dell'oncogene *MLL-AF9*, mediante un oligonucleotide antisense fosforotioato (MLL-AF9-PS-ODNas), induceva una forte inibizione della proliferazione cellulare, senza nessun segno evidente di maturazione terminale (Pession *et al.*, 2003). Quindi, abbiamo pensato di valutare se l'inibizione della proliferazione indotta dall'oligonucleotide MLL-AF9-PS-ODNas potesse “sensibilizzare” le cellule THP-1 al differenziamento terminale indotto dall'M-CSF. In figura 22 sono riportati gli effetti specifici dell'oligonucleotide MLL-AF9-PS-ODNas, nelle cellule THP-1 e nell'inibizione dell'espressione di *MLL-AF9*.

È stato anche verificato se l'inibizione della crescita delle cellule THP-1, indotta dall'oligonucleotide MLL-AF9-PS-ODNas fosse legata a processi di morte cellulare (apoptosi e/o necrosi). La figura 23 mostra che l'oligonucleotide MLL-AF9-PS-ODNas induceva solo una lieve diminuzione, di circa il 20%, delle cellule THP-1 vitali.

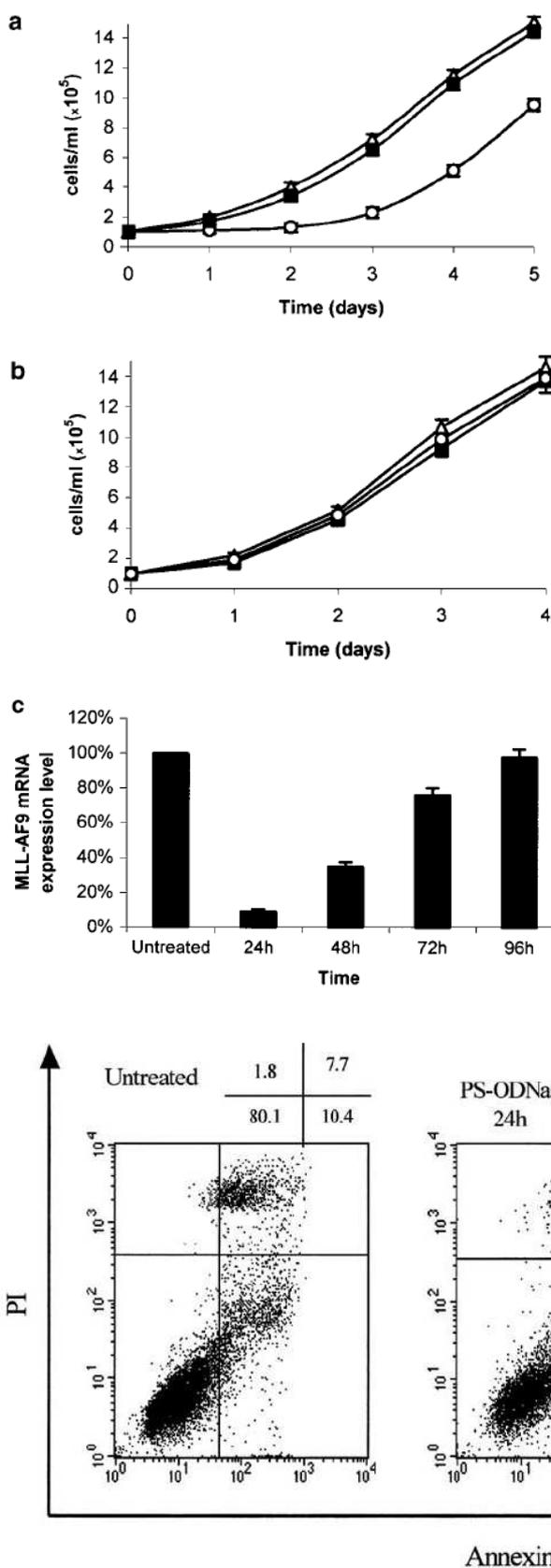


Figura 22. Effetto di MLL-AF9-PS-ODNas sulla proliferazione delle cellule THP-1(a) e HL-60 (b). Le cellule (5×10^5 cells/ml) erano non trattate (Δ) o trattate con $20 \mu\text{M}$ di MLL-AF9-PS-ODNas (\circ) o $20 \mu\text{M}$ MLL-AF9-PS-ODNas (\blacksquare). La Streptolisina-O (SLO) era usata per permeabilizzare reversibilmente le cellule verso i PS-ODN. Il numero di cellule iniziali era di 1×10^5 cells/ml. La vitalità cellulare era valutata mediante il test di esclusione del colorante trypan-blue. I valori rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di 3 esperimenti diversi. (c) analisi di RT-PCR semiquantitativa real-time che dimostra come l'espressione dell'mRNA di MLL-AF9 sia inibita di circa il 90% rispetto al controllo, dopo 24h dal trattamento con MLL-AF9-PS-ODNas; successivamente, vi è aumento dell'espressione dell'mRNA di MLL-AF9, che correla con una ripresa della proliferazione cellulare (Figura 1a, c).

Figura 23. Analisi dell'apoptosi in cellule THP-1 trattate con l'oligonucleotide MLL-AF9-PS-ODNas dopo 0, 24 e 48 h. I numeri indicati rappresentano la percentuale di cellule in ciascun quadrante, rispetto al numero totale di cellule analizzate (10000).

È stata effettuata anche un'analisi sugli effetti dell'oligonucleotide MLL-AF9-PS-ODNas sul ciclo cellulare delle cellule THP-1. La figura 24 mostra le cellule THP-1 di controllo e trattate con MLL-AF9-PS-ODNas dopo 24h e 48h, nelle varie fasi del ciclo cellulare. Dalle percentuali corrispondenti si evidenzia, tra il controllo e le cellule trattate, una diminuzione (di oltre il 10%) del numero di cellule presenti in fase S, ed un aumento (di oltre il 10%) di cellule presenti in fase G2/M. Invece restano invariate le percentuali di cellule presenti nelle fase G1.

Nella cellule THP-1 trattate con MLL-AF9-PS-ODNas dopo 48h è stata evidenziata anche la percentuale di cellule apoptotiche, in quanto essa superava un certo valore soglia dello strumento. Invece, nel controllo e dopo trattamento con MLL-AF9-PS-ODNas dopo 24h, la popolazione di cellule THP-1 apoptotiche non era stata evidenziata dallo stesso strumento.

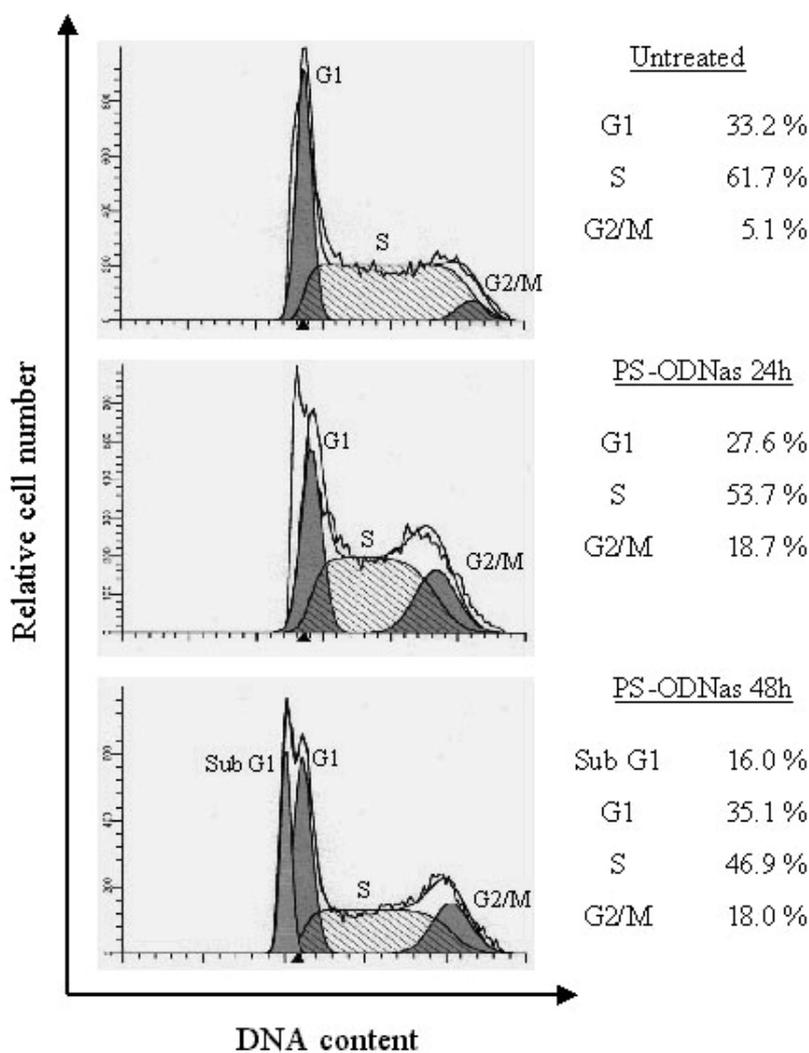
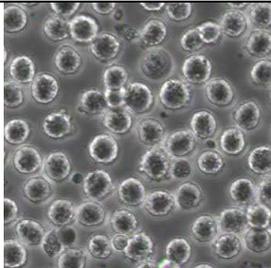
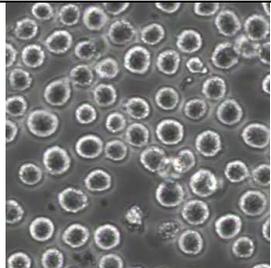
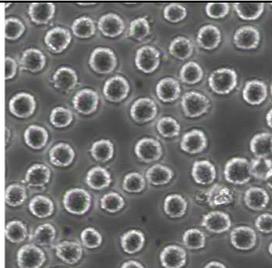


Figura 24. Analisi del ciclo cellulare in cellule THP-1 trattate con l'oligonucleotide MLL-AF9-PS-ODNas dopo 0, 24 e 48 h.

Dopo aver analizzato gli effetti dell' MLL-AF9-PS-ODNas sulla crescita, abbiamo valutato se l'aggiunta dell' M-CSF fosse in grado di aumentare le caratteristiche differenziative delle cellule THP-1. Come si può notare dalla tabella 14 e dal grafico in figura 25, non c'era nessuna differenza significativa tra il trattamento con MLL-AF9-PS-ODNas singolo e quello in combinazione con M-CSF. In entrambi i casi, le cellule THP-1 non mostrano nessun segno morfo-funzionale di differenziamento monocito-macrofagico terminale.

Tabella 14. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con MLL-AF9-PS-ODNas singolo ed in combinazione con M-CSF (alla concentrazione di 30 ng/ml).

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (100.000 cell/ml iniziali)		
	Controllo	MLL-AF9-PS-ODNas	MLL-AF9-PS-ODNas + M-CSF
Morfologia			
Aderenza	non presente	non presente	non presente
Numero cell/ml inibizione proliferazione	610000 0 %	200000 80	220000 77
NBT	42.4 ± 3.1 %	43.3 ± 2.1 %	43.8 ± 2.6 %
Fagocitosi	4.1 ± 0.3 %	5.7 ± 0.3 %	5.9 ± 0.6 %
CD 11b	8.5 ± 1.2 %	9.5 ± 1.1 %	9.7 ± 0.9 %
CD 14	3.6 ± 0.4 %	3.7 ± 0.3 %	3.5 ± 0.5 %

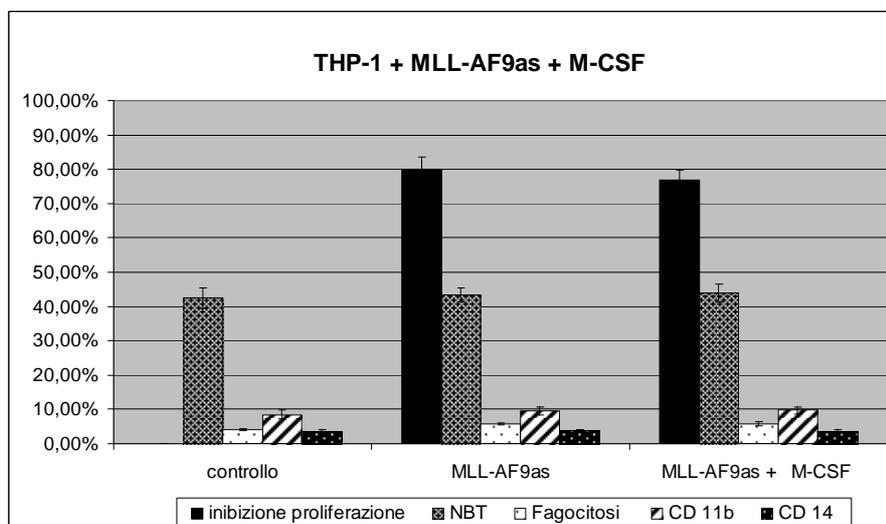


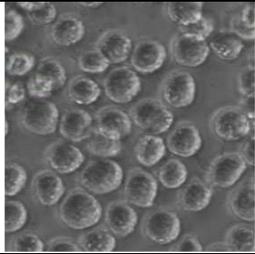
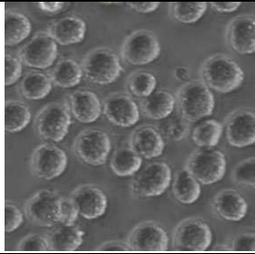
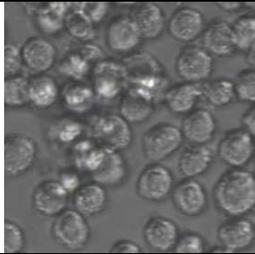
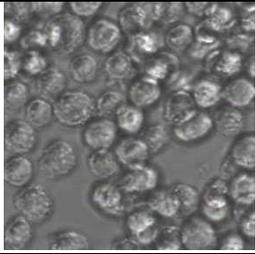
Figura 25. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 14, rappresentano le medie ± le deviazioni standard di due esperimenti separati.

In conclusione, l'analisi appena illustrata indica che l'inibizione della proliferazione cellulare non è sufficiente per ripristinare il differenziamento monocito-macrofagico terminale, indotto dall'M-CSF, in cellule THP-1.

A questo punto abbiamo pensato di valutare anche gli effetti di combinazioni di M-CSF alla concentrazione di 30 ng/ml ed IFN- γ a concentrazioni minori di 1000 U/ml (cioè 40, 100 e 500 U/ml). Ciò perché, come mostrato in tabella 9 ed in figura 17, l'IFN- γ induce inibizione della proliferazione delle cellule THP-1 già a concentrazioni di 40 U/ml. Come si vede dalla tabella 15 e dal grafico in figura 26, l'IFN- γ riesce a "sensibilizzare" le cellule THP-1, al differenziamento indotto dall'M-CSF, solo alla concentrazione di 1000 U/ml e non a concentrazioni inferiori (40, 100 e 500 U/ml). Questo risultato conferma che l'inibizione della proliferazione cellulare non è sufficiente per ripristinare l'induzione del differenziamento terminale, indotto dall'M-CSF nelle cellule THP-1.

Capire in che modo l'IFN- γ , alla concentrazione di 1000 U/ml, riesce a ripristinare il differenziamento indotto dall'M-CSF sarebbe di grande interesse clinico; infatti, l'M-CSF che, singolarmente non ha nessun effetto, potrebbe essere preso in considerazione in un'eventuale "terapia differenziante", a patto che sia utilizzato in combinazione con qualche agente "sensibilizzante". Purtroppo per tale scopo, l'IFN- γ non può essere preso in considerazione in clinica, poiché la concentrazione di 1000 U/ml è molto al di sopra della concentrazione massima tollerata di IFN- γ (circa 40 U/ml).

Tabella 15. Risultati del trattamento delle cellule THP-1 con combinazioni di M-CSF + IFN- γ a varie concentrazioni

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	IFN- γ 40 U/ml + M-CSF 30 ng/ml	IFN- γ 100 U/ml + M-CSF 30 ng/ml	IFN- γ 500 U/ml + M-CSF 30 ng/ml
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	non presente	non presente
Numero cell/ml	1040000	480000	410000	350000
inibiz proliferaz	0 %	67 %	75 %	82 %
NBT	42.4 \pm 3.1 %	43.5 \pm 2.7 %	43.1 \pm 3.3%	46.6 \pm 3.4 %
Fagocitosi	4.1 \pm 0.3 %	4.3 \pm 0.6 %	4.4 \pm 0.5 %	4.2 \pm 0.4 %
CD 11b	8.5 \pm 1.2 %	8.9 \pm 0.6 %	11.4 \pm 0.8 %	15.6 \pm 2.5 %
CD 14	3.6 \pm 0.4 %	3.8 \pm 0.2 %	3.2 \pm 0.7 %	3.5 \pm 0.7%

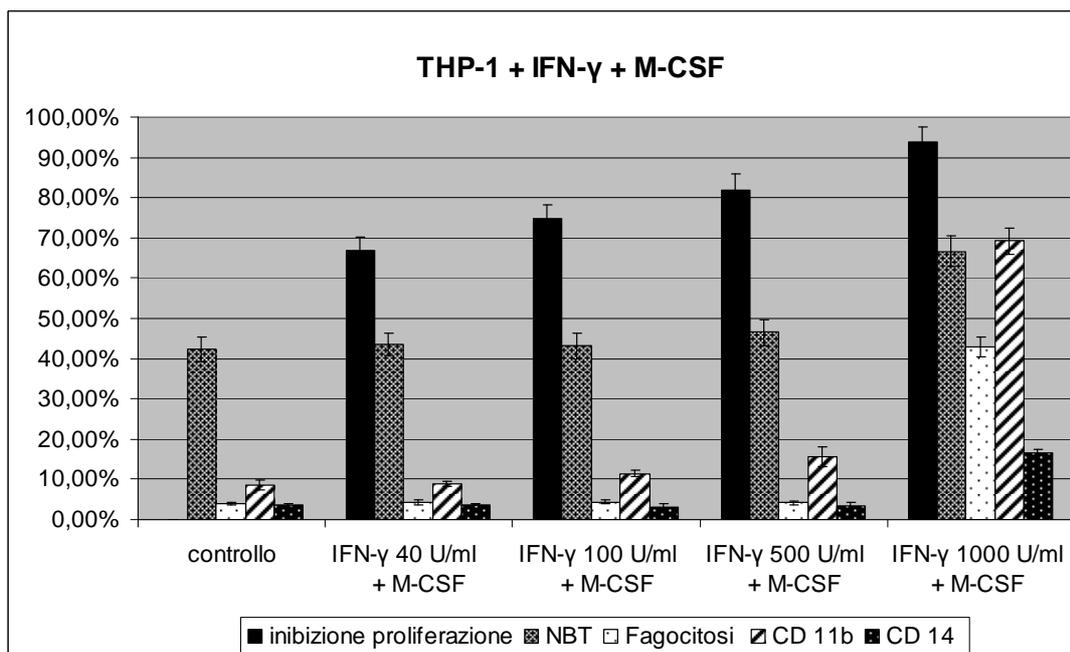


Figura 26. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 15, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati. Nel grafico è stato aggiunto anche il trattamento con IFN- γ a 1000 U/ml + M-CSF, illustrato in figura 21, per evidenziare il differente risultato ottenuto a tale concentrazione di IFN- γ .

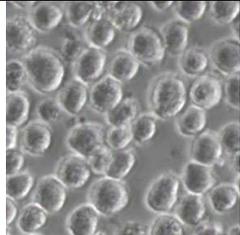
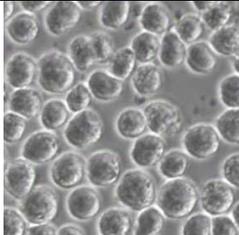
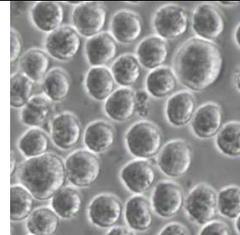
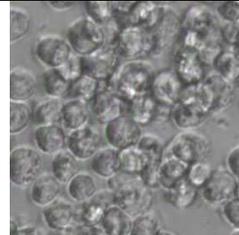
6.2.5. Effetti della decitabina a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23)

Nelle cellule neoplastiche e, quindi, anche in quelle leucemiche, i geni che inducono il differenziamento terminale potrebbero essere mantenuti in uno stato di repressione trascrizionale, mediante meccanismi epigenetici. Come visto nell'introduzione, uno di tali meccanismi consiste nell'iper-metilazione del DNA, in particolare di regioni del DNA associate a promotori genici (Jones and Baylin, 2007; Robertson and Wolffe, 2000). Attualmente, due agenti che causano ipometilazione del DNA sono in uso clinico; si tratta della 5-azacitidina e della 5-Aza-2'-deossicitidina o decitabina (figura 9b) (Jain *et al.*, 2009). Per quanto riguarda la decitabina, sono stati effettuati diversi studi clinici di fase I-II; da tali studi risulta che la concentrazione ematica di tale farmaco, alla massima dose tollerata, è di 1,6 μM (Blum *et al.*, 2007).

Abbiamo pensato di valutare, gli effetti della decitabina alle concentrazioni clinicamente ottenibili di 0,1 0,5 e 1 μM , nelle linee cellulari THP-1 e MOLM-13. Le tabelle 16 e 17 ed i grafici in figura 27 e 28 mostrano i risultati ottenuti, per quanto riguarda la proliferazione, l'aderenza e le caratteristiche differenziative del *lineage* monocito-macrofagico (capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi ed espressione dei CD 11b e 14). I risultati ottenuti hanno indicato che la decitabina era in grado di indurre inibizione della proliferazione cellulare, sia nelle cellule THP-1 che nelle MOLM-13; in particolare si aveva circa il 50% di inibizione alla concentrazione di 0,5 μM , ed oltre l'80% di inibizione alla concentrazione di 1 μM . Le cellule THP-1 mostravano aderenza parziale (circa 50%), alla concentrazione di decitabina di 1 μM ; invece le cellule MOLM-13 non mostravano aderenza a nessuna delle concentrazioni utilizzate. Nelle cellule THP-1, la decitabina alla concentrazione di 1 μM induceva un incremento di tutte le caratteristiche differenziative analizzate, indicando l'induzione di un fenotipo più differenziato. Anche nelle cellule MOLM-13 c'era un aumento dei valori di tali caratteristiche differenziative, ma più lieve rispetto alle cellule THP-1.

In conclusione, quest'analisi indica che la decitabina, alla concentrazione clinicamente ottenibile di 1 μM , è in grado di indurre inibizione della crescita sia nelle cellule THP-1 che nelle MOLM-13; inoltre, riesce ad indurre anche un maggiore fenotipo differenziato, più accentuato nelle cellule THP-1.

Tabella 16. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con dosi scalari di Decitabina.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	DEC 0,1 μ M	DEC 0,5 μ M	DEC 1 μ M
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	non presente	parziale (~ 50%)
Numero cell/ml inibiz proliferaz	970000 0 %	850000 16 %	580000 51 %	300000 87 %
NBT	42.4 \pm 3.1 %	45.1 \pm 2.2 %	46.8 \pm 2.8 %	58.3 \pm 3.4 %
Fagocitosi	4.1 \pm 0.3 %	6.1 \pm 0.6 %	9.2 \pm 1.0 %	15.4 \pm 1.4 %
CD 11b	8.5 \pm 1.2 %	7.7 \pm 0.6 %	12.9 \pm 2.2 %	21.3 \pm 1.1 %
CD 14	3.6 \pm 0.4 %	3.3 \pm 0.6 %	3.5 \pm 0.7 %	13.5 \pm 0.9 %

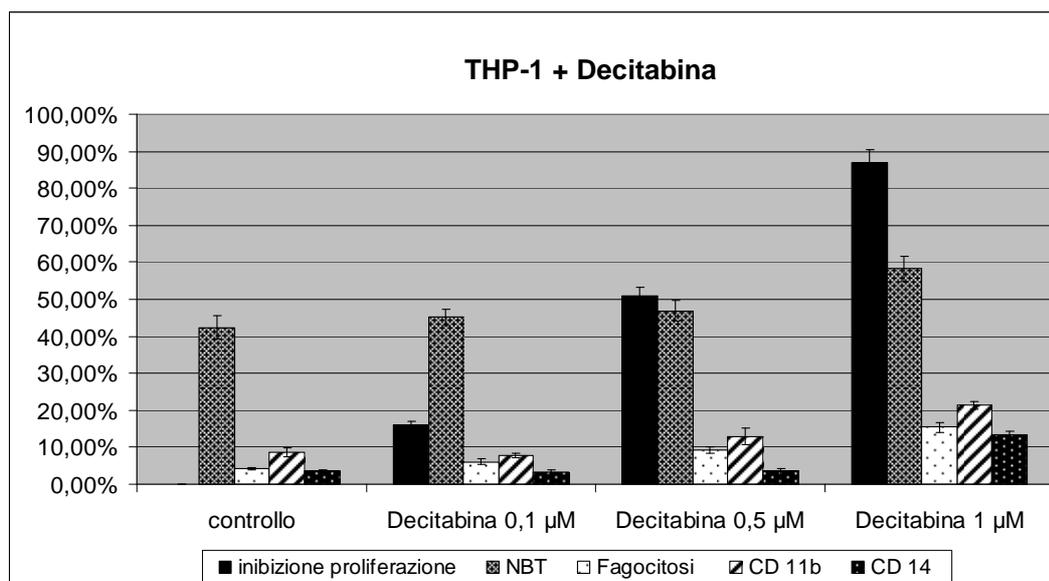
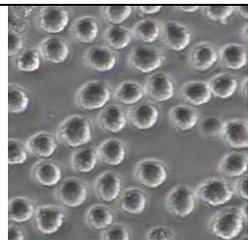
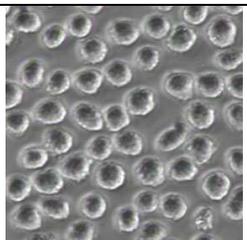
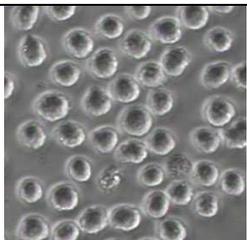
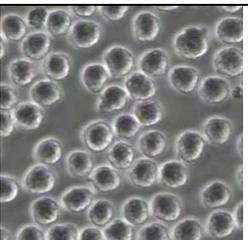


Figura 27. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 16, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di tre esperimenti separati.

Tabella 17. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule MOLM-13 con dosi scalari di Decitabina.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	DEC 0,1 μ M	DEC 0,5 μ M	DEC 1 μ M
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	non presente	non presente
Numero cell/ml inibiz proliferaz	620000 0 %	580000 10 %	430000 45 %	280000 81 %
NBT	22.1 \pm 2.6 %	23.2 \pm 2.8 %	23.8 \pm 2.5 %	36.2 \pm 2.1 %
Fagocitosi	3.4 \pm 0.3 %	3.1 \pm 0.3 %	4.2 \pm 0.6 %	16.2 \pm 1.2 %
CD 11b	2.6 \pm 0.5 %	2.9 \pm 0.6 %	2.6 \pm 0.6 %	22.1 \pm 0.5 %
CD 14	2.2 \pm 0.4 %	2.1 \pm 0.5 %	2.4 \pm 0.6 %	12.8 \pm 0.4 %

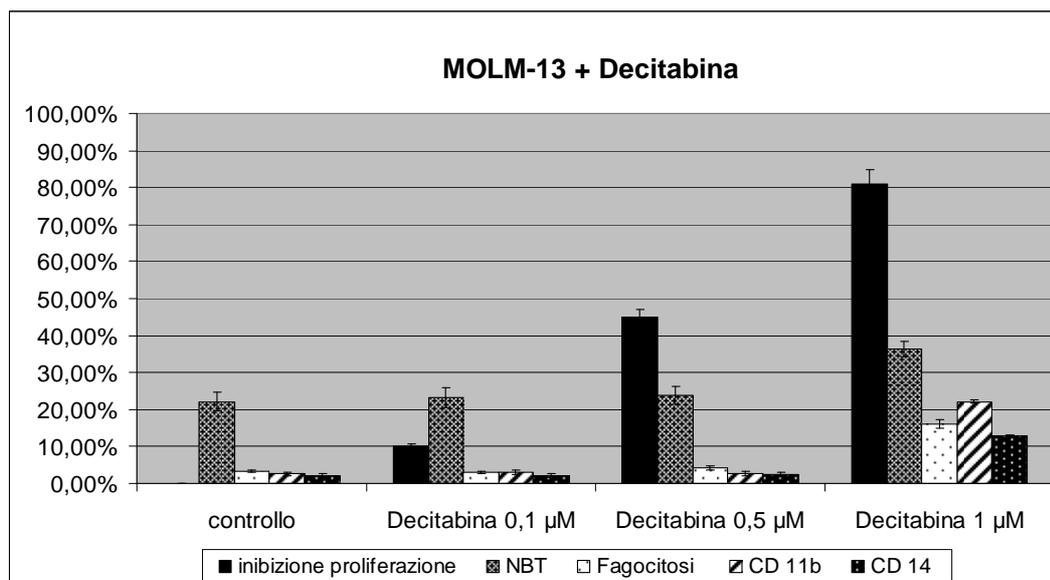


Figura 28. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule MOLM-13. I valori, elencati in tabella 17, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di tre esperimenti separati.

È stato anche verificato se l'inibizione della crescita, nelle linee cellulari THP-1 e MOLM-13, indotta dalla decitabina (alla concentrazione di 1 μM), fosse dovuta a fenomeni di morte cellulare (ovvero presenza di apoptosi e/o necrosi cellulare). Tale analisi è stata eseguita dopo 72 ore dal trattamento con decitabina (1 μM). Come si può osservare dal grafico in figura 29, sia le cellule THP-1 che le cellule MOLM-13, trattate con decitabina (1 μM), non presentano alcun incremento nella percentuale di cellule apoptotiche o necrotiche, rispetto al controllo. Quindi, l'inibizione della crescita, nelle linee cellulari THP-1 e MOLM-13 da parte della decitabina, non è dovuta ad induzione di processi che portano alla morte cellulare.

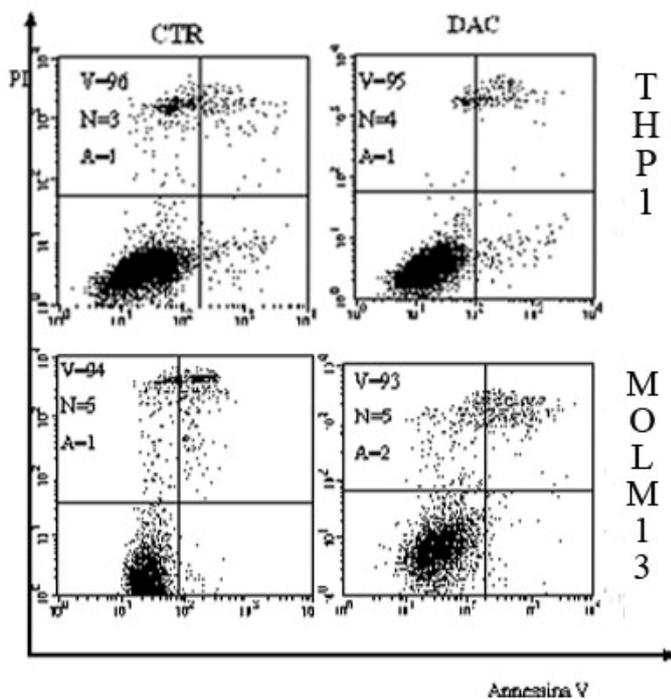
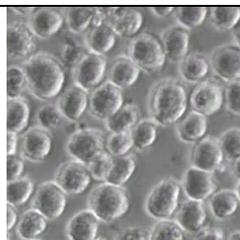
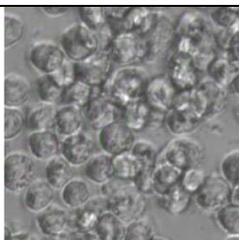
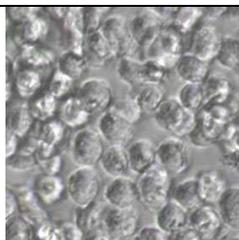


Figura 29. Analisi dell'apoptosi in cellule THP-1 e MOLM13 trattate con decitabina (1 μM) dopo 72 ore. I numeri indicati rappresentano la percentuale di cellule vive (V), necrotiche (N) ed apoptotiche (A), rispetto al numero totale di cellule analizzate (10000).

Nell'insieme questi dati indicano che la decitabina presenta significativi effetti antileucemici, in linee cellulari con traslocazione $t(9;11)(q21;q23)$, anche a concentrazioni rilevate in clinica. Quindi, la decitabina può essere presa in considerazione per studi di combinazione con altre molecole, a concentrazioni clinicamente ottenibili, per indurre il differenziamento e/o la morte di questo tipo di cellule leucemiche.

A questo proposito, abbiamo analizzato se la decitabina, in combinazione con l'M-CSF, potesse indurre maggiori effetti differenziativi, rispetto alla decitabina singola, nelle cellule THP-1. Come si vede dalla tabella 18 e dal grafico in figura 30, il trattamento combinato con decitabina (alla concentrazione di 1 μ M) ed M-CSF (alla concentrazione di 30 ng/ml) induce, in pratica, gli stessi effetti del trattamento con decitabina singola.

Tabella 18. Risultati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con la combinazione di Decitabina (1 μ M) + M-CSF (30 ng/ml).

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)		
	Controllo	DEC 1 μ M	DEC 1 μ M + M-CSF
Morfologia			
Aderenza	non presente	parziale (~ 50%)	parziale (~ 50%)
Numero cell/ml	970000	300000	290000
inibizione proliferazione	0 %	87 %	88 %
NBT	42.4 \pm 3.1 %	58.3 \pm 3.4 %	60.1 \pm 2.8 %
Fagocitosi	4.1 \pm 0.3 %	15.4 \pm 1.4 %	15.0 \pm 1.3 %
CD 11b	8.5 \pm 1.2 %	21.3 \pm 1.1 %	23.8 \pm 2.2 %
CD 14	3.6 \pm 0.4 %	13.5 \pm 0.9 %	14.0 \pm 0.8 %

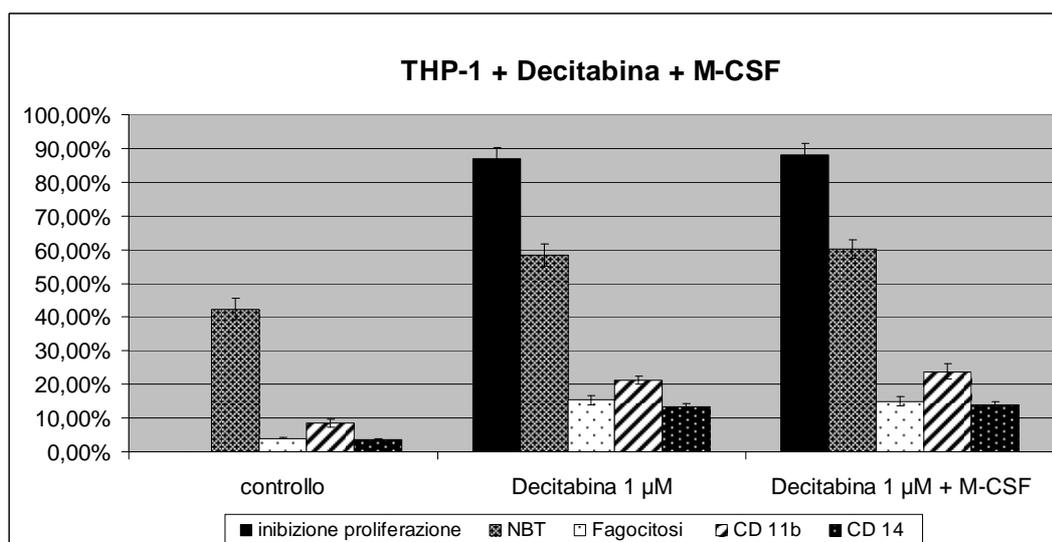


Figura 30. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 18, rappresentano le medie \pm le deviazioni standard di due esperimenti separati.

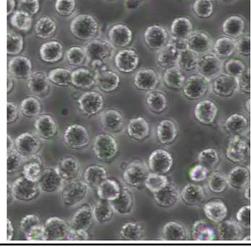
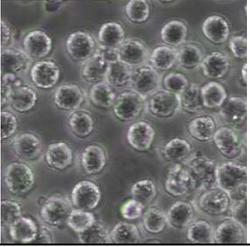
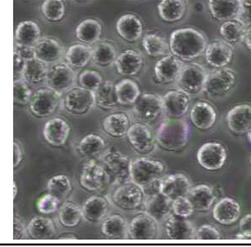
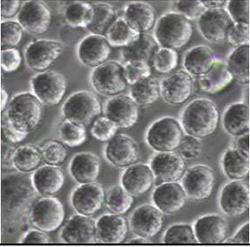
6.2.6. Effetti della vitamina D3 a dosi cliniche in cellule con traslocazione t(9;11)(q21;q23).

Il differenziamento terminale delle cellule emopoietiche può essere influenzato anche da alcune vitamine, che sono composti biochimicamente distinti dalle citochine e dai fattori di crescita ematopoietici. Le vitamine sono in grado di esercitare i loro effetti biologici mediante l'interazione con specifici recettori nucleari. Tali recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori steroidei (Kumar and Thompson, 1999) e sono caratterizzati dall'abilità di promuovere l'attivazione della trascrizione genica, dopo il legame del rispettivo ligando (Norman, 2006; Whitfield *et al.*, 1999). Un esempio di vitamina in grado di controllare la normale ematopoiesi è rappresentato dalla forma attiva della vitamina D: 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3). Concentrazioni fisiologiche di VD3 nel siero umano variano tra 0,5 e 2×10^{-10} M (cioè 0,05 - 0,2 nM), arrivando fino a 5×10^{-10} M (cioè 0,5 nM) in alcune condizioni parafisiologiche (Holick *et al.*, 1992). È stato dimostrato che livelli fisiologici di VD3 inducono il differenziamento, lungo il *lineage* monocitico, in normali progenitori ematopoietici CD34+ (Grande *et al.*, 2002). Molte cellule leucemiche (da pazienti o linee cellulari) esprimono il recettore per la VD3 (VD3R), ma sono resistenti al differenziamento terminale monocito-macrofagico, indotto da livelli fisiologici di VD3. Tuttavia, è stato dimostrato che la VD3 a concentrazioni sovralfisiologiche (circa 10^{-7} M; 100 nM) è un potente induttore del differenziamento monocito-macrofagico, per blasti e linee cellulari di leucemia acuta mieloide, con fenotipo M2, M3 o M5 (Grande *et al.*, 1997; Studzinski *et al.*, 1993). Studi clinici di fase I hanno dimostrato che, quando la VD3 viene somministrata endovena alla massima dose tollerata, i livelli ematici massimi di VD3 sono di circa 15 nM (Fakih *et al.*, 2007; Muindi *et al.*, 2009), una concentrazione inferiore a quella necessaria per ottenere il differenziamento, *in vitro*, della maggior parte delle cellule leucemiche.

Anche le cellule THP-1 esprimono il recettore VD3R, sono resistenti al differenziamento indotto da livelli fisiologici di VD3, ma possono differenziare lungo il *lineage* monocito-macrofagico dopo trattamento con 100 nM di VD3 (Hmama *et al.*, 1999; Kizaki *et al.*, 1991; Schwende *et al.*, 1996). La tabella 19 ed il grafico in figura 31 mostrano gli effetti di varie concentrazioni di VD3, nelle cellule THP-1. I risultati ottenuti indicano che la VD3 a concentrazioni fisiologiche non induce effetti rilevanti; alla concentrazione farmacologica di 5 nM induce qualche effetto parziale di inibizione della proliferazione e di incremento di alcune caratteristiche

differenziative; alla concentrazione di 100 nM (non possibile in clinica), la VD3 induce significativi effetti di inibizione di proliferazione e di differenziamento terminale.

Tabella 19. Dati ottenuti dopo trattamento delle cellule THP-1 con dosi scalari di VD3.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	VD3 0,1 nM Concentrazione fisiologica - (sangue)	VD3 5 nM Concentrazione farmacologica	VD3 100 nM Concentrazione tossica (in clinica)
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	non presente	presente
Numero cell/ml inibiz proliferaz	990000 0	860000 16 %	690000 37 %	360000 80 %
NBT	42.4 ± 3.1 %	40.1 ± 2.2 %	46.8 ± 2.5 %	58.8 ± 2.9 %
Fagocitosi	4.1 ± 0.3 %	3.8 ± 0.3 %	8.2 ± 1.0 %	42.9 ± 2.1 %
CD 11b	8.5 ± 1.2 %	10.5 ± 0.8 %	22.1 ± 1.3 %	65.5 % ± 3.2 %
CD 14	3.6 ± 0.4 %	5.9 ± 0.3 %	21.5 ± 1.2 %	71.0 % ± 3.4 %

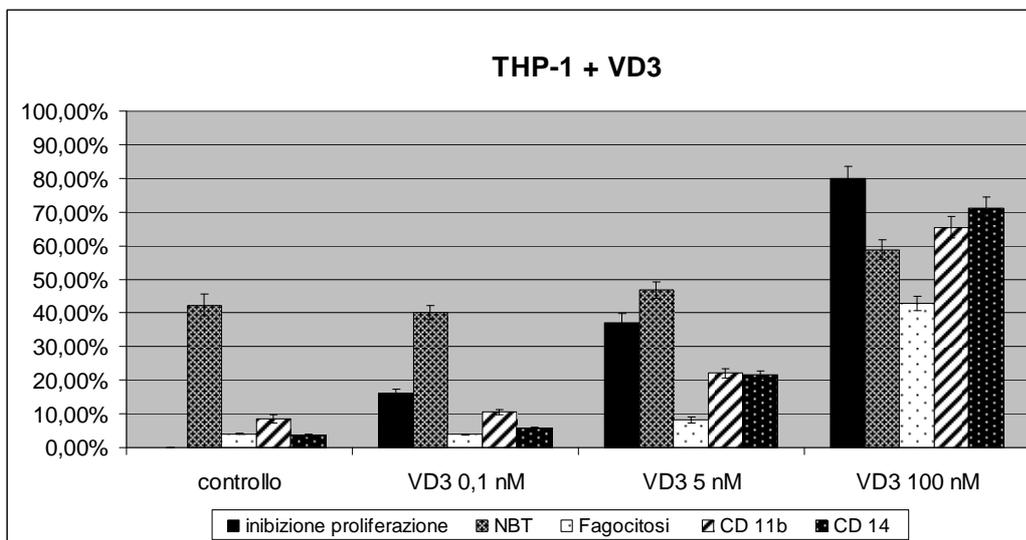
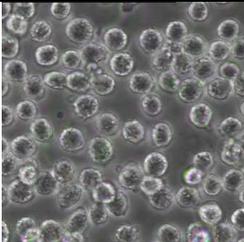
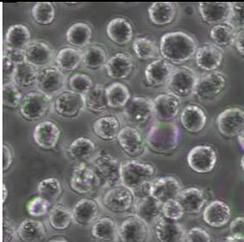
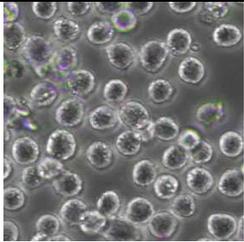


Figura 31. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 19, rappresentano le medie ± le deviazioni standard di due esperimenti separati.

Poichè la VD3 a concentrazioni farmacologiche (5nM) induce dei lievi effetti, nelle cellule THP-1, abbiamo valutato se tali effetti potessero essere incrementati dall'aggiunta dell'M-CSF. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 20 e nel grafico di figura 32. Tali risultati indicano che la combinazione VD3 (5nM) + M-CSF (30 ng/ml), in cellule THP-1, induce effetti simili a quelli indotti dal trattamento con VD3 singola.

Tabella 20. Dati ottenuti dopo trattamento con la combinazione VD3 (5 nM) + M-CSF (30 ng/ml), in cellule THP-1

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)		
	Controllo	VD3 5nM	VD3 5nM + M-CSF
Morfologia			
Aderenza	non presente	non presente	non presente
Numero cell/ml inibizione proliferazione	970000 0 %	690000 37 %	670000 38 %
NBT	42.4 ± 3.1 %	46.8 ± 2.5 %	45.2 ± 2.3 %
Fagocitosi	4.1 ± 0.3 %	8.2 ± 1.0 %	9.4 ± 1.1 %
CD 11b	8.5 ± 1.2 %	22.1 ± 1.3 %	24.1 ± 1.2 %
CD 14	3.6 ± 0.4 %	21.5 ± 1.2 %	23.2 ± 1.3 %

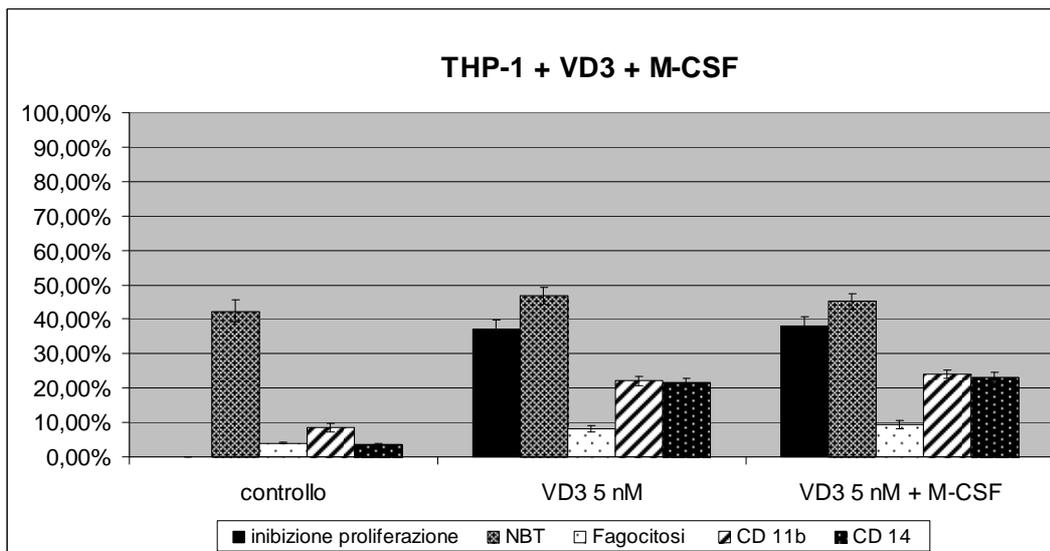


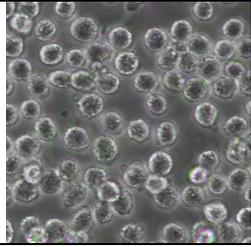
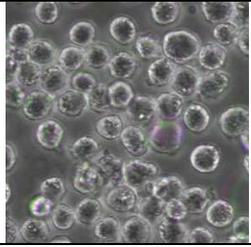
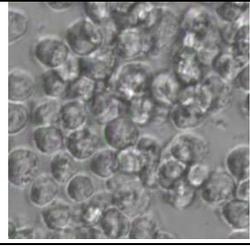
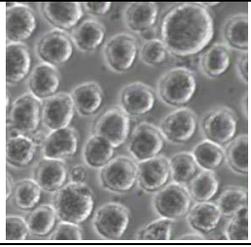
Figura 32. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 20, rappresentano le medie ± le deviazioni standard di due esperimenti separati.

A questo punto, sono stati valutati, nelle cellule THP-1, gli effetti della combinazione VD3 (5nM) + DEC (1 µM). I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 21 e nel grafico di figura 33 ed indicano che tale combinazione di farmaci, in cellule THP-1, induceva maggiori effetti, rispetto a quelli indotti dal trattamento con VD3 e decitabina singolarmente. In particolare, si notava un aumento del numero di cellule aderenti alla fiasca di coltura, senza adesione omotipica; inoltre, le cellule presentavano una maggiore dimensione, rispetto alle cellule di controllo e a quelle trattate con VD3 e decitabina singolarmente. Infine, tutte le caratteristiche differenziative analizzate erano aumentate, suggerendo che tale combinazione agisce in modo sinergico, per indurre il differenziamento terminale lungo il *lineage* monocito-macrofagico.

È stato riportato che la combinazione VD3 + DEC, a concentrazioni clinicamente ottenibili, è in grado di incrementare in modo sinergico le caratteristiche del differenziamento terminale lungo il *lineage* monocitico anche in altre linee cellulari di LAM con riarrangiamenti di *MLL* (Niitsu et al., 2001). Inoltre, tale combinazione è risultata efficace anche nell'induzione del differenziamento monocitico terminale della linea cellulare U937, che presenta caratteristiche monocitiche, ma non possiede riarrangiamenti di *MLL* (Abrink et al., 1994) e in cellule di blasti di pazienti con LAM (Koschmieder *et al.*, 2007).

In conclusione, questi dati mettono in evidenza che la strategia di combinare agenti ipometilanti, come la decitabina, ed agenti che inducono il differenziamento terminale monocito-macrofagico, come la VD3, presenta due caratteristiche molto interessanti: primo, tale combinazione è in grado di indurre significativi effetti antileucemici, in diversi modelli cellulari di LAM monocitica, *in vitro*; secondo, tali effetti antileucemici si ottengono a concentrazioni di DEC e VD3 potenzialmente ottenibili in clinica. Quindi, la combinazione DEC + VD3 merita di essere ulteriormente valutata, allo scopo di trovare un trattamento per poter ristabilire una normale emopoiesi, in pazienti con LAM monocitica. Attualmente, stiamo analizzando tale combinazione in altre linee cellulari leucemiche, con traslocazione t(9;11)(q21;q23); se i risultati saranno positivi, allora bisognerebbe provare tale combinazione in modelli *in vivo*, per valutarne l'efficacia e la tossicità.

Tabella 21. Dati ottenuti dopo trattamento con la combinazione VD3 (5 nM) + DEC (1 μM), in cellule THP-1.

Valutazioni	Risultati dopo 72 h di trattamento (200.000 cell/ml iniziali)			
	Controllo	VD3 5 nM	DEC 1 μM	VD3 5 nM + DEC 1 μM
Morfologia				
Aderenza	non presente	non presente	parziale (~ 30%)	parziale (~ 50%)
Numero cell/ml	990000	690000	300000	280000
inibiz proliferaz	0	37 %	87 %	90 %
NBT	42.4 ± 3.1 %	46.8 ± 2.5 %	58.3 ± 3.4 %	72.1 ± 3.2 %
Fagocitosi	4.1 ± 0.3 %	8.2 ± 1.0 %	15.4 ± 1.4 %	21.7 ± 1.5 %
CD 11b	8.5 ± 1.2 %	22.1 ± 1.3 %	21.3 ± 1.1 %	41.4 ± 2.8 %
CD 14	3.6 ± 0.4 %	21.5 ± 1.2 %	13.5 ± 0.9 %	38.8 ± 2.3%

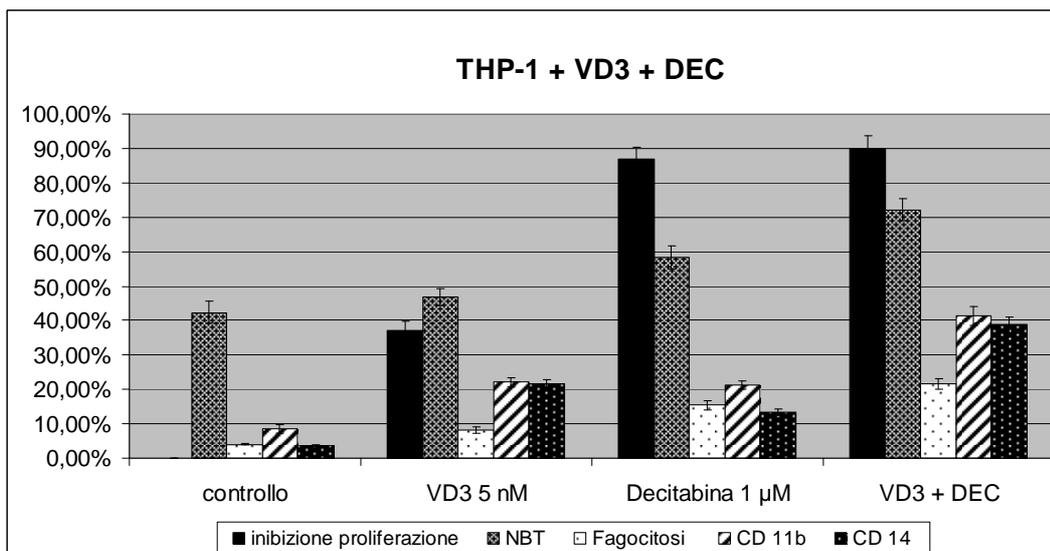


Figura 33. Per ogni trattamento, sono illustrate in percentuale l'inibizione della proliferazione, la capacità di ridurre l'NBT e di fagocitosi e l'espressione superficiale del CD11b e CD14, nelle cellule THP-1. I valori, elencati in tabella 21, rappresentano le medie ± le deviazioni standard di tre esperimenti separati.

7. BIBLIOGRAFIA

Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* **20**: 56-9.

Abrahm JL, Gerson SL, Hoxie JA, Tannenbaum SH, Cassileth PA, Cooper RA (1986). Differential effects of phorbol esters on normal myeloid precursors and leukemic cells: basis for autologous bone marrow reconstitution in acute nonlymphocytic leukemia using phorbol ester-treated bone marrow from patients in remission. *Cancer Res* **46**: 3711-6.

Abrink M, Gobl AE, Huang R, Nilsson K, Hellman L (1994). Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage. *Leukemia* **8**: 1579-84.

Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ, Jr. *et al* (1999). Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol* **19**: 7050-60.

Andersen MK, Christiansen DH, Jensen BA, Ernst P, Hauge G, Pedersen-Bjergaard J (2001). Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992. *Br J Haematol* **114**: 539-43.

Argiropoulos B, Humphries RK (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**: 6766-76.

Argiropoulos B, Yung E, Humphries RK (2007). Unraveling the crucial roles of Meis1 in leukemogenesis and normal hematopoiesis. *Genes Dev* **21**: 2845-9.

Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD *et al* (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* **30**: 41-7.

Auwerx J (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**: 22-31.

Ayton PM, Cleary ML (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* **17**: 2298-307.

Becton D, Dahl GV, Ravindranath Y, Chang MN, Behm FG, Raimondi SC *et al* (2006). Randomized use of cyclosporin A (CsA) to modulate P-glycoprotein in children with AML in remission: Pediatric Oncology Group Study 9421. *Blood* **107**: 1315-24.

Bender AT, Ostenson CL, Giordano D, Beavo JA (2004). Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression. *Cell Signal* **16**: 365-74.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR *et al* (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**: 451-8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR *et al* (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* **103**: 620-5.
- Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH (2000). Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* **96**: 24-33.
- Blum W, Klisovic RB, Hackanson B, Liu Z, Liu S, Devine H *et al* (2007). Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **25**: 3884-91.
- Bonifer C, Hume DA (2008). The transcriptional regulation of the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (csf1r) gene during hematopoiesis. *Front Biosci* **13**: 549-60.
- Brach MA, Riedel D, Herrmann F (1990). Induction of monocytic differentiation and modulation of the expression of c-fos, c-fms and c-myc protooncogenes in human monoblasts by cytokines and phorbol ester. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **59**: 54-8.
- Brock HW, van Lohuizen M (2001). The Polycomb group--no longer an exclusive club? *Curr Opin Genet Dev* **11**: 175-81.
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-93.
- Butler LH, Slany R, Cui X, Cleary ML, Mason DY (1997). The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* **89**: 3361-70.
- Carlo Stella C, Cazzola M, Ganser A, Bergamaschi G, Meloni F, Pedrazzoli P *et al* (1988). Recombinant gamma-interferon induces in vitro monocytic differentiation of blast cells from patients with acute nonlymphocytic leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2**: 55-9.
- Caslini C, Alarcon AS, Hess JL, Tanaka R, Murti KG, Biondi A (2000). The amino terminus targets the mixed lineage leukemia (MLL) protein to the nucleolus, nuclear matrix and mitotic chromosomal scaffolds. *Leukemia* **14**: 1898-908.
- Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, Reaman GH, Korsmeyer SJ, Heerema NA *et al* (1993). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* **81**: 2386-93.
- Chen J, Santillan DA, Koonce M, Wei W, Luo R, Thirman MJ *et al* (2008a). Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer Res* **68**: 6199-207.
- Chen W, Kumar AR, Hudson WA, Li Q, Wu B, Staggs RA *et al* (2008b). Malignant transformation initiated by Mll-AF9: gene dosage and critical target cells. *Cancer Cell* **13**: 432-40.

Chowdhury T, Brady HJ (2008). Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis* **40**: 192-9.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E (2001). Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* **188**: 161-9.

Cimino G, Moir DT, Canaani O, Williams K, Crist WM, Katzav S *et al* (1991). Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Res* **51**: 6712-4.

Cole DJ, Sanda MG, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Weber J, Ettinghausen SE *et al* (1994). Phase I trial of recombinant human macrophage colony-stimulating factor administered by continuous intravenous infusion in patients with metastatic cancer. *J Natl Cancer Inst* **86**: 39-45.

Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN *et al* (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3260-5.

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**: 347-9.

Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA *et al* (1996). An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* **85**: 853-61.

Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, Reinhardt D, Hermann J, Berthold F *et al* (2001). Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Munster 93. *J Clin Oncol* **19**: 2705-13.

Cross SH, Meehan RR, Nan X, Bird A (1997). A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* **16**: 256-9.

Cui XX, Chang RL, Zheng X, Woodward D, Strair R, Conney AH (2002). A sensitive bioassay for measuring blood levels of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients: preliminary pharmacokinetic studies. *Oncol Res* **13**: 169-74.

Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM (1988). HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* **71**: 242-7.

Datta R, Imamura K, Goldman SJ, Dianoux AC, Kufe DW, Sherman ML (1992). Functional expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor in human THP-1 monocytic leukemia cells. *Blood* **79**: 904-12.

DeVita V, Jr, Hellman S, Rosenberg S (2004). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Seventh edn. Lippincott Williams & Wilkins

Dimartino JF, Cleary ML (1999). Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol* **106**: 614-26.

- Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* **2**: 113-8.
- Dluzniewska A, Balwierz W, Armata J, Balcerska A, Chybicka A, Kowalczyk J *et al* (2005). Twenty years of Polish experience with three consecutive protocols for treatment of childhood acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **19**: 2117-24.
- Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Lavenir I, Corral J *et al* (1999). The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *Embo J* **18**: 3564-74.
- Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK *et al* (2009). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*.
- Douglass TG, Driggers L, Zhang JG, Hoa N, Delgado C, Williams CC *et al* (2008). Macrophage colony stimulating factor: not just for macrophages anymore! A gateway into complex biologies. *Int Immunopharmacol* **8**: 1354-76.
- Eklund EA (2007). The role of HOX genes in malignant myeloid disease. *Curr Opin Hematol* **14**: 85-9.
- Emambokus N, Vegiopoulos A, Harman B, Jenkinson E, Anderson G, Frampton J (2003). Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb. *EMBO J* **22**: 4478-88.
- Ennas MG, Sorio C, Greim R, Nieddu M, Scarpa A, Orlandini S *et al* (1997). The human ALL-1/MLL/HRX antigen is predominantly localized in the nucleus of resting and proliferating peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res* **57**: 2035-41.
- Entz-Werle N, Suciú S, van der Werff ten Bosch J, Vilmer E, Bertrand Y, Benoit Y *et al* (2005). Results of 58872 and 58921 trials in acute myeloblastic leukemia and relative value of chemotherapy vs allogeneic bone marrow transplantation in first complete remission: the EORTC Children Leukemia Group report. *Leukemia* **19**: 2072-81.
- Ernst P, Wang J, Huang M, Goodman RH, Korsmeyer SJ (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* **21**: 2249-58.
- Fair K, Anderson M, Bulanova E, Mi H, Tropschug M, Diaz MO (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* **21**: 3589-97.
- Fakih MG, Trump DL, Muindi JR, Black JD, Bernardi RJ, Creaven PJ *et al* (2007). A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **13**: 1216-23.
- Fang B, Song Y, Han Z, Wei X, Lin Q, Zhu X *et al* (2007). Synergistic interactions between 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in blastic phase that is resistant to standard-dose imatinib. *Leuk Res* **31**: 1441-4.
- Felix CA (2001). Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Med Pediatr Oncol* **36**: 525-35.

- Felix CA, Hosler MR, Winick NJ, Masterson M, Wilson AE, Lange BJ (1995). ALL-1 gene rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* **85**: 3250-6.
- Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ *et al* (2003). Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* **102**: 262-8.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S *et al* (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**: 713-33.
- Galoian K, Milne TA, Brock H, Shilatifard A, Slany R, Hess JL (2000). Deregulation of c-MYC by leukemogenic MLL fusion proteins. *Blood Supplement*: 457a.
- Gibson BE, Wheatley K, Hann IM, Stevens RF, Webb D, Hills RK *et al* (2005). Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* **19**: 2130-8.
- Giles RV, Spiller DG, Green JA, Clark RE, Tidd DM (1995a). Optimization of antisense oligodeoxynucleotide structure for targeting bcr-abl mRNA. *Blood* **86**: 744-54.
- Giles RV, Spiller DG, Tidd DM (1995b). Detection of ribonuclease H-generated mRNA fragments in human leukemia cells following reversible membrane permeabilization in the presence of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res Dev* **5**: 23-31.
- Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* **57**: 367-78.
- Grande A, Manfredini R, Pizzanelli M, Tagliafico E, Balestri R, Trevisan F *et al* (1997). Presence of a functional vitamin D receptor does not correlate with vitamin D3 phenotypic effects in myeloid differentiation. *Cell Death Differ* **4**: 497-505.
- Grande A, Montanari M, Tagliafico E, Manfredini R, Zanocco Marani T, Siena M *et al* (2002). Physiological levels of 1alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. *J Leukoc Biol* **71**: 641-51.
- Greaves MF (1996). Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. *Leukemia* **10**: 372-7.
- Greig KT, Carotta S, Nutt SL (2008). Critical roles for c-Myb in hematopoietic progenitor cells. *Semin Immunol* **20**: 247-56.
- Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G *et al* (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene. *Cell* **71**: 701-8.
- Han ZT, Tong YK, He LM, Zhang Y, Sun JZ, Wang TY *et al* (1998a). 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced increase in depressed white blood cell counts in patients treated with cytotoxic cancer chemotherapeutic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5362-5.

Han ZT, Zhu XX, Yang RY, Sun JZ, Tian GF, Liu XJ *et al* (1998b). Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5357-61.

Hanamura T, Motoyoshi K, Yoshida K, Saito M, Miura Y, Kawashima T *et al* (1988). Quantitation and identification of human monocytic colony-stimulating factor in human serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **72**: 886-92.

Harper DP, Aplan PD (2008). Chromosomal rearrangements leading to MLL gene fusions: clinical and biological aspects. *Cancer Res* **68**: 10024-7.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J *et al* (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* **17**: 3835-49.

Hendrich B, Bird A (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**: 6538-47.

Hess JL, Bittner CB, Zeisig DT, Bach C, Fuchs U, Borkhardt A *et al* (2006). c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* **108**: 297-304.

Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ (1997). Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**: 1799-806.

Hidaka T, Akada S, Teranishi A, Morikawa H, Sato S, Yoshida Y *et al* (2003). Mirimostim (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) improves chemotherapy-induced impaired natural killer cell activity, Th1/Th2 balance, and granulocyte function. *Cancer Sci* **94**: 814-20.

Hilden JM, Smith FO, Frestedt JL, McGlennen R, Howells WB, Sorensen PH *et al* (1997). MLL gene rearrangement, cytogenetic 11q23 abnormalities, and expression of the NG2 molecule in infant acute myeloid leukemia. *Blood* **89**: 3801-5.

Hmama Z, Nandan D, Sly L, Knutson KL, Herrera-Velit P, Reiner NE (1999). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex. *J Exp Med* **190**: 1583-94.

Holick MF, Krane SM, Potts Jr. JT (1992). Calcium, phosphorus and bone metabolism: calcium regulating hormones. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th edn. McGraw-Hill New York.

Hsieh JJ, Cheng EH, Korsmeyer SJ (2003a). Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**: 293-303.

Hsieh JJ, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (2003b). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* **23**: 186-94.

Iida S, Seto M, Yamamoto K, Komatsu H, Tojo A, Asano S *et al* (1993). MLLT3 gene on 9p22 involved in t(9;11) leukemia encodes a serine/proline rich protein homologous to MLLT1 on 19p13. *Oncogene* **8**: 3085-92.

Ikeno K, Koike K, Fukuromoto T, Shimizu T, Nagatomo M, Komiyama A (1996). Increased macrophage-colony stimulating factor levels in neonates with perinatal complications. *Early Hum Dev* **46**: 229-37.

Jain N, Rossi A, Garcia-Manero G (2009). Epigenetic therapy of leukemia: An update. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 72-80.

Joh T, Hosokawa Y, Suzuki R, Takahashi T, Seto M (1999). Establishment of an inducible expression system of chimeric MLL-LTG9 protein and inhibition of Hox a7, Hox b7 and Hox c9 expression by MLL-LTG9 in 32Dcl3 cells. *Oncogene* **18**: 1125-30.

Johnson JJ, Chen W, Hudson W, Yao Q, Taylor M, Rabbitts TH *et al* (2003). Prenatal and postnatal myeloid cells demonstrate stepwise progression in the pathogenesis of MLL fusion gene leukemia. *Blood* **101**: 3229-35.

Jones PA, Baylin SB (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**: 683-92.

Kardos G, Zwaan CM, Kaspers GJ, de-Graaf SS, de Bont ES, Postma A *et al* (2005). Treatment strategy and results in children treated on three Dutch Childhood Oncology Group acute myeloid leukemia trials. *Leukemia* **19**: 2063-71.

Kaspers GJ, Zwaan CM (2007). Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* **92**: 1519-32.

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE (1999). Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* **13**: 687-98.

Kawagoe H, Kawagoe R, Sano K (2001). Targeted down-regulation of MLL-AF9 with antisense oligodeoxynucleotide reduces the expression of the HOXA7 and -A10 genes and induces apoptosis in a human leukemia cell line, THP-1. *Leukemia* **15**: 1743-9.

Kimball ES, Kovacs E, Clark MC, Schneider CR (1995). Activation of cytokine production and adhesion molecule expression on THP-1 myelomonocytic cells by macrophage colony-stimulating factor in combination with interferon-gamma. *J Leukoc Biol* **58**: 585-94.

Kizaki M, Norman AW, Bishop JE, Lin CW, Karmakar A, Koeffler HP (1991). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor RNA: expression in hematopoietic cells. *Blood* **77**: 1238-47.

Koeffler HP, Bar-Eli M, Territo MC (1981). Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation. *Cancer Res* **41**: 919-26.

Koschmieder S, Agrawal S, Radomska HS, Huettner CS, Tenen DG, Ottmann OG *et al* (2007). Decitabine and vitamin D3 differentially affect hematopoietic transcription factors to induce monocytic differentiation. *Int J Oncol* **30**: 349-55.

- Krivtsov AV, Armstrong SA (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**: 823-33.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J *et al* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* **442**: 818-22.
- Kumar AR, Hudson WA, Chen W, Nishiuchi R, Yao Q, Kersey JH (2004). Hoxa9 influences the phenotype but not the incidence of Mll-AF9 fusion gene leukemia. *Blood* **103**: 1823-8.
- Kumar R, Thompson EB (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64**: 310-9.
- Lane HC, Davey RT, Jr., Sherwin SA, Masur H, Rook AH, Manischewitz JF *et al* (1989). A phase I trial of recombinant human interferon-gamma in patients with Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Clin Immunol* **9**: 351-61.
- Larionov A, Krause A, Miller W (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6**: 62.
- Larson RS, Brown DC, Sklar LA (1997). Retinoic acid induces aggregation of the acute promyelocytic leukemia cell line NB-4 by utilization of LFA-1 and ICAM-2. *Blood* **90**: 2747-56.
- Lavau C, Szilvassy SJ, Slany R, Cleary ML (1997). Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J* **16**: 4226-37.
- Lie SO, Abrahamsson J, Clausen N, Forestier E, Hasle H, Hovi L *et al* (2003). Treatment stratification based on initial in vivo response in acute myeloid leukaemia in children without Down's syndrome: results of NOPHO-AML trials. *Br J Haematol* **122**: 217-25.
- Look AT (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**: 1059-64.
- Lotem J, Sachs L (1979). Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 5158-62.
- Luong QT, Koeffler HP (2005). Vitamin D compounds in leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* **97**: 195-202.
- Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6348-52.
- Martino V, Tonelli R, Montemurro L, Franzoni M, Marino F, Fazzina R *et al* (2006). Down-regulation of MLL-AF9, MLL and MYC expression is not obligatory for monocyte-macrophage maturation in AML-M5 cell lines carrying t(9;11)(p22;q23). *Oncol Rep* **15**: 207-11.
- Matsuo Y, MacLeod RA, Uphoff CC, Drexler HG, Nishizaki C, Katayama Y *et al* (1997). Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). *Leukemia* **11**: 1469-77.

- McKee LC, Jr., Collins RD (1974). Intravascular leukocyte thrombi and aggregates as a cause of morbidity and mortality in leukemia. *Medicine (Baltimore)* **53**: 463-78.
- Mehta K, Lopez-Berestein G (1986). Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation. *Cancer Res* **46**: 1388-94.
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD *et al* (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* **10**: 1107-17.
- Mitchell PJ, Tjian R (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-8.
- Mitelman HS (1995). *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Aberrations of Tumor Cell, 2nd edn.*: New York.
- Montemurro L, Tonelli R, Fazzina R, Martino V, Marino F, Pession A (2004). Identification of two MLL-MLLT3 (alias MLL-AF9) chimeric transcripts in the MOLM-13 cell line. *Cancer Genet Cytogenet* **154**: 96-7.
- Mrozek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru PR, Rao KW *et al* (1997). Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood* **90**: 4532-8.
- Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA *et al* (1991). A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**: 677-89.
- Mufson RA (1990). Induction of immediate early response genes by macrophage colony-stimulating factor in normal human monocytes. *J Immunol* **145**: 2333-9.
- Muindi JR, Johnson CS, Trump DL, Christy R, Engler KL, Fakhri MG (2009). A phase I and pharmacokinetics study of intravenous calcitriol in combination with oral dexamethasone and gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**: 33-40.
- Muntean AG, Giannola D, Udager AM, Hess JL (2008). The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood* **112**: 4690-3.
- Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N *et al* (1993). Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4631-5.
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R *et al* (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**: 1119-28.
- Niitsu N, Hayashi Y, Sugita K, Honma Y (2001). Sensitization by 5-aza-2'-deoxycytidine of leukaemia cells with MLL abnormalities to induction of differentiation by all-trans retinoic acid and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Br J Haematol* **112**: 315-26.

- Nilson I, Lochner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH *et al* (1996). Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* **93**: 966-72.
- Norman AW (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* **147**: 5542-8.
- Nowak D, Stewart D, Koeffler HP (2009). Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* **113**: 3655-65.
- Odero MD, Zeleznik-Le NJ, Chinwalla V, Rowley JD (2000). Cytogenetic and molecular analysis of the acute monocytic leukemia cell line THP-1 with an MLL-AF9 translocation. *Genes Chromosomes Cancer* **29**: 333-8.
- Oren H, Duman N, Abacioglu H, Ozkan H, Irken G (2001). Association between serum macrophage colony-stimulating factor levels and monocyte and thrombocyte counts in healthy, hypoxic, and septic term neonates. *Pediatrics* **108**: 329-32.
- Pelengaris S, Khan M, Evan G (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* **2**: 764-76.
- Perel Y, Auvrignon A, Leblanc T, Vannier JP, Michel G, Nelken B *et al* (2002). Impact of addition of maintenance therapy to intensive induction and consolidation chemotherapy for childhood acute myeloblastic leukemia: results of a prospective randomized trial, LAME 89/91. *Leucemie Aigue Myeloide Infant. J Clin Oncol* **20**: 2774-82.
- Pession A, Martino V, Tonelli R, Beltramini C, Locatelli F, Biserni G *et al* (2003). MLL-AF9 oncogene expression affects cell growth but not terminal differentiation and is downregulated during monocyte-macrophage maturation in AML-M5 THP-1 cells. *Oncogene* **22**: 8671-6.
- Pession A, Rondelli R, Basso G, Rizzari C, Testi AM, Fagioli F *et al* (2005). Treatment and long-term results in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP AML protocols. *Leukemia* **19**: 2043-53.
- Petrie K, Zelent A, Waxman S (2009). Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. *Curr Opin Hematol* **16**: 84-91.
- Pixley FJ, Stanley ER (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* **14**: 628-38.
- Polliack A, Leizerowitz R, Korkesh A, Gurfel D, Gamliel H, Galili U (1982). Exposure to phorbol diester (TPA) in vitro as an aid in the classification of blasts in human myelogenous and lymphoid leukemias: in vitro differentiation, growth patterns, and ultrastructural observations. *Am J Hematol* **13**: 199-211.
- Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y *et al* (1995). Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12160-4.
- Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP *et al* (1999). Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics

and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood* **94**: 3707-16.

Ramsay RG, Gonda TJ (2008). MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer* **8**: 523-34.

Rasio D, Schichman SA, Negrini M, Canaani E, Croce CM (1996). Complete exon structure of the ALL1 gene. *Cancer Res* **56**: 1766-9.

Ravandi F (2006). Role of cytokines in the treatment of acute leukemias: a review. *Leukemia* **20**: 563-71.

Redman BG, Flaherty L, Chou TH, Kraut M, Martino S, Simon M *et al* (1992). Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor by rapid intravenous infusion in patients with cancer. *J Immunother (1991)* **12**: 50-4.

Ribeiro RC, Razzouk BI, Pounds S, Hijiya N, Pui CH, Rubnitz JE (2005). Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. *Leukemia* **19**: 2125-9.

Robertson KD, Wolffe AP (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* **1**: 11-9.

Rogaia D, Grignani F, Carbone R, Riganelli D, LoCoco F, Nakamura T *et al* (1997). The localization of the HRX/ALL1 protein to specific nuclear subdomains is altered by fusion with its eps15 translocation partner. *Cancer Res* **57**: 799-802.

Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK *et al* (2003). Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* **102**: 2951-9.

Rozen S, Skaletsky H (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-86.

Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D, Sedkov Y, Tillib S, Blechman J *et al* (1998). The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4152-7.

Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, Carroll AJ, Hakami N, Frankel LS *et al* (1994a). Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* **84**: 570-3.

Rubnitz JE, Morrissey J, Savage PA, Cleary ML (1994b). ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* **84**: 1747-52.

Rubnitz JE, Raimondi SC, Tong X, Srivastava DK, Razzouk BI, Shurtleff SA *et al* (2002). Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **20**: 2302-9.

Sanda MG, Yang JC, Topalian SL, Groves ES, Childs A, Belfort R, Jr. *et al* (1992). Intravenous administration of recombinant human macrophage colony-stimulating factor to patients with metastatic cancer: a phase I study. *J Clin Oncol* **10**: 1643-9.

Schaar D, Goodell L, Aisner J, Cui XX, Han ZT, Chang R *et al* (2006). A phase I clinical trial of 12- O-tetradecanoylphorbol-13-acetate for patients with relapsed/refractory malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**: 789-95.

Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T (2003). AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO-classification: Incidence, partner chromosomes, FAB-subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML. *Blood*.

Schulte CE, von Lindern M, Steinlein P, Beug H, Wiedemann LM (2002). MLL-ENL cooperates with SCF to transform primary avian multipotent cells. *Embo J* **21**: 4297-306.

Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* **59**: 555-61.

Shkolnik T, Schlossman SF, Griffin JD (1985). Acute undifferentiated leukemia: induction of partial differentiation by phorbol ester. *Leuk Res* **9**: 11-7.

Slany RK (2009). The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* **94**: 984-93.

Slany RK, Lavau C, Cleary ML (1998). The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol* **18**: 122-9.

Somerville TC, Cleary ML (2006). Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10**: 257-68.

Spiller DG, Giles RV, Broughton CM, Grzybowski J, Ruddell CJ, Tidd DM *et al* (1998a). The influence of target protein half-life on the effectiveness of antisense oligonucleotide analog-mediated biologic responses. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **8**: 281-93.

Spiller DG, Giles RV, Grzybowski J, Tidd DM, Clark RE (1998b). Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cells: a comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation. *Blood* **91**: 4738-46.

Spiller DG, Tidd DM (1995). Nuclear delivery of antisense oligodeoxynucleotides through reversible permeabilization of human leukemia cells with streptolysin O. *Antisense Res Dev* **5**: 13-21.

Stock W, Thirman MJ, Dodge RK, Rowley JD, Diaz MO, Wurster-Hill D *et al* (1994). Detection of MLL gene rearrangements in adult acute lymphoblastic leukemia. A Cancer and Leukemia Group B study. *Leukemia* **8**: 1918-22.

Stone RM (2002). The difficult problem of acute myeloid leukemia in the older adult. *CA Cancer J Clin* **52**: 363-71.

Stone RM, Spriggs DR, Arthur KA, Mayer RJ, Griffin J, Kufe DW (1993). Recombinant human gamma interferon administered by continuous intravenous infusion in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Oncol* **16**: 159-63.

Strair RK, Schaar D, Goodell L, Aisner J, Chin KV, Eid J *et al* (2002). Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Clin Cancer Res* **8**: 2512-8.

Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV *et al* (2007). Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* **13**: 5048-55.

Strissel PL, Strick R, Tomek RJ, Roe BA, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (2000). DNA structural properties of AF9 are similar to MLL and could act as recombination hot spots resulting in MLL/AF9 translocations and leukemogenesis. *Hum Mol Genet* **9**: 1671-9.

Studzinski GP, McLane JA, Uskokovic MR (1993). Signaling pathways for vitamin D-induced differentiation: implications for therapy of proliferative and neoplastic diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **3**: 279-312.

Super HJ, Martinez-Climent J, Rowley JD (1995). Molecular analysis of the Mono Mac 6 cell line: detection of an MLL-AF9 fusion transcript. *Blood* **85**: 855-6.

Swansbury GJ, Slater R, Bain BJ, Moorman AV, Secker-Walker LM (1998). Hematological malignancies with t(9;11)(p21-22;q23)--a laboratory and clinical study of 125 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* **12**: 792-800.

Takeda S, Chen DY, Westergard TD, Fisher JK, Rubens JA, Sasagawa S *et al* (2006). Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* **20**: 2397-409.

Taki T, Ida K, Bessho F, Hanada R, Kikuchi A, Yamamoto K *et al* (1996). Frequency and clinical significance of the MLL gene rearrangements in infant acute leukemia. *Leukemia* **10**: 1303-7.

Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, Moleti ML, Giona F, Vignetti M *et al* (2005). GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *Blood* **106**: 447-53.

Theill LE, Castrillo JL, Wu D, Karin M (1989). Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. *Nature* **342**: 945-8.

Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**: 691-700.

Tomizawa D, Tabuchi K, Kinoshita A, Hanada R, Kigasawa H, Tsukimoto I *et al* (2007). Repetitive cycles of high-dose cytarabine are effective for childhood acute myeloid leukemia: long-term outcome of the children with AML treated on two consecutive trials of Tokyo Children's Cancer Study Group. *Pediatr Blood Cancer* **49**: 127-32.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T *et al* (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* **42**: 1530-6.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**: 171-6.

- Vahdat L, Maslak P, Miller WH, Jr., Eardley A, Heller G, Scheinberg DA *et al* (1994). Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RAR-alpha isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid. *Blood* **84**: 3843-9.
- Vijapurkar U, Fischbach N, Shen W, Brandts C, Stokoe D, Lawrence HJ *et al* (2004). Protein kinase C-mediated phosphorylation of the leukemia-associated HOXA9 protein impairs its DNA binding ability and induces myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* **24**: 3827-37.
- Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR (1999). Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem Suppl* **32-33**: 110-22.
- Wong P, Iwasaki M, Somervaille TC, So CW, Cleary ML (2007). Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes Dev* **21**: 2762-74.
- Woods WG, Neudorf S, Gold S, Sanders J, Buckley JD, Barnard DR *et al* (2001). A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. *Blood* **97**: 56-62.
- Xia ZB, Anderson M, Diaz MO, Zeleznik-Le NJ (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8342-7.
- Xie Y, Chen C, Hume DA (2001). Transcriptional regulation of c-fms gene expression. *Cell Biochem Biophys* **34**: 1-16.
- Yagi H, Deguchi K, Aono A, Tani Y, Kishimoto T, Komori T (1998). Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* **92**: 108-17.
- Yamamoto K, Seto M, Iida S, Komatsu H, Kamada N, Kojima S *et al* (1994). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects heterogeneous chimeric mRNAs in leukemias with 11q23 abnormalities. *Blood* **83**: 2912-21.
- Yano T, Nakamura T, Blechman J, Sorio C, Dang CV, Geiger B *et al* (1997). Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7286-91.
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R *et al* (2002). Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* **1**: 133-43.
- Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML, Ohki M (2002). Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* **100**: 3710-8.
- Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ (1998). MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10632-6.

Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**: 505-8.

Zelevnik-Le NJ, Harden AM, Rowley JD (1994). 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10610-4.

Ziegler-Heitbrock HW, Schraut W, Wendelgass P, Strobel M, Sternsdorf T, Weber C *et al* (1994). Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J Leukoc Biol* **55**: 73-80.

Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* **41**: 456-61.

Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, III, Patel Y, Harden A *et al* (1991). Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10735-9.