

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

PROGETTO N°5

SCIENZE MORFOLOGICHE UMANE E MOLECOLARI

Ciclo XXIII

**Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: BIO/16 - Anatomia Umana**

Valutazione preclinica di oligonucleotidi antisenso  
come nuovo approccio terapeutico specifico  
per le leucemie acute con riarrangiamenti di MLL

**Presentata da: Dott.ssa Lorenza Lombardini**

**Coordinatore Dottorato**

**Chiar.mo Prof. Lucio Cocco**

**Relatori**

**Chiar.mo Prof. Lucio Cocco**

**Chiar.mo Prof. Andrea Pession**

**Correlatore**

**Dott. Roberto Tonelli**

**Esame finale anno 2011**

**Alla mia famiglia**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>pag. 6</b>
<b>1. Leucemie .....</b>	<b>pag. 6</b>
<b>1.1 Definizione .....</b>	<b>pag. 6</b>
<b>1.2 Classificazione .....</b>	<b>pag. 9</b>
<b>1.3 Incidenza .....</b>	<b>pag. 13</b>
<b>1.4 Eziologia .....</b>	<b>pag. 15</b>
<b>1.5 Presentazione clinica e diagnosi .....</b>	<b>pag. 17</b>
<b>1.6 Terapia .....</b>	<b>pag. 22</b>
<b>1.6.1 LAL .....</b>	<b>pag. 22</b>
<b>1.6.2 LAM .....</b>	<b>pag. 23</b>
<b>2. Il gene MLL .....</b>	<b>pag. 25</b>
<b>2.1 Ruolo di MLL nello sviluppo e nell'ematopoiesi         embrionale .....</b>	<b>pag. 25</b>
<b>2.2 Espressione di MLL <i>wild-type</i> .....</b>	<b>pag. 28</b>
<b>2.3 Leucemie con traslocazione del gene MLL .....</b>	<b>pag. 29</b>
<b>2.4 Struttura del gene e della proteina MLL .....</b>	<b>pag. 30</b>
<b>2.4.1 Motivi strutturali della porzione amino-terminale (N-terminale)                 .....</b>	<b>pag. 31</b>
<b>2.4.2 Motivi strutturali della porzione carbossi-terminale (C-                 terminale) .....</b>	<b>pag. 33</b>
<b>2.4.3 Processamento post-traduzionale della proteina MLL ....</b>	<b>pag. 35</b>
<b>2.4.4 <i>Breakpoint region</i> .....</b>	<b>pag. 36</b>
<b>2.5 Traslocazioni 11q23 .....</b>	<b>pag. 41</b>
<b>2.5.1 Traslocazione t(9;11) (p22;q23) .....</b>	<b>pag. 42</b>
<b>2.5.2 Traslocazione t(4;11)(q21;q23) .....</b>	<b>pag. 43</b>
<b>2.5.3 Traslocazione t(11;19)(q23;p13.3) .....</b>	<b>pag. 44</b>

2.5.4 Traslocazione t(X;11)(q13.1;q23) .....	pag. 45
2.5.5 Traslocazione t(6;11)(q27;q23) .....	pag. 46
<b>3. <i>Small Interfering RNA (siRNA)</i> .....</b>	<b>pag. 47</b>
<b>3.1 Introduzione .....</b>	<b>pag. 47</b>
<b>3.2 Applicazioni <i>in vivo</i> .....</b>	<b>pag. 53</b>
3.2.1 <i>Off-target effects</i> .....	pag. 53
3.2.2 <i>Delivery</i> .....	pag. 54
3.2.3 Risposta immunitaria innata .....	pag. 62
3.2.4 Studi preclinici .....	pag. 63
<b>3.3 <i>Design</i> .....</b>	<b>pag. 65</b>
<b>4. Modelli murini .....</b>	<b>pag. 68</b>
<b>5. <i>Imaging bioluminescente in vivo</i> .....</b>	<b>pag. 70</b>
<b>SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>pag. 72</b>
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>pag. 74</b>
<b>1. Linee Cellulari .....</b>	<b>pag. 74</b>
<b>2. <i>Design</i> dei siRNA .....</b>	<b>pag. 75</b>
<b>3. Trattamento con siRNA .....</b>	<b>pag. 76</b>
<b>4. RT-PCR .....</b>	<b>pag. 79</b>
<b>5. Real-Time PCR .....</b>	<b>pag. 79</b>
<b>6. <i>Gene expression</i> .....</b>	<b>pag. 82</b>
<b>7. Analisi proteica .....</b>	<b>pag. 84</b>
<b>8. Clonaggio .....</b>	<b>pag. 85</b>
<b>9. Valutazione della bioluminescenza tramite siRNA .....</b>	<b>pag. 86</b>

10. Sviluppo di modelli murini <i>xenograft</i> di leucemie acute .....	pag. 87
11. <i>Delivery in vivo</i> .....	pag. 90

**RISULTATI .....**pag. 93

1. <i>Design</i> dei siRNA .....	pag. 93
2. Valutazione della vitalità cellulare .....	pag. 96
3. Real-Time PCR .....	pag. 99
4. <i>Gene expression</i> .....	pag. 101
5. Analisi proteica .....	pag. 103
6. Clonaggio .....	pag. 105
7. Valutazione della bioluminescenza tramite siRNA .....	pag. 107
8. Sviluppo di modelli murini <i>xenograft</i> di leucemie acute .....	pag. 108
9. <i>Delivery in vivo</i> .....	pag. 114

**DISCUSSIONE .....**pag. 121

1. Analisi bioinformatica .....	pag. 123
2. Analisi cellulari molecolari e di proliferazione .....	pag. 124
3. Analisi proteica .....	pag. 136
4. Analisi di bioluminescenza .....	pag. 137
5. Studi <i>in vivo</i> .....	pag. 138

**CONCLUSIONI .....**pag. 144

**BIBLIOGRAFIA .....**pag. 146

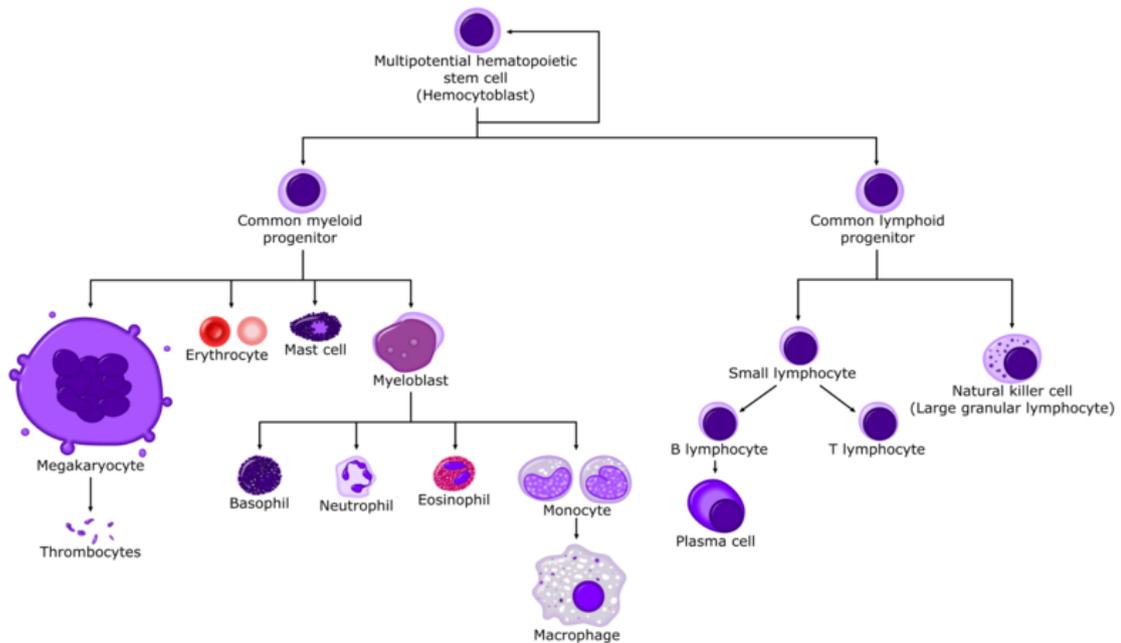
# INTRODUZIONE

## 1. Leucemie

### 1.1 Definizione

Le leucemie sono neoplasie del sistema emopoietico, hanno origine monoclonale da una cellula staminale emopoietica e sono caratterizzate da proliferazione incontrollata, blocco della differenziazione, alterazione dei meccanismi che regolano il ciclo cellulare e l'apoptosi <sup>[1-3]</sup>. Nel feto le cellule del sangue si originano nel fegato, nella milza, nel timo e nel midollo osseo, mentre dopo la nascita l'unico sito di produzione di cellule del sangue rimane il midollo osseo. Le cellule del sangue si originano da una popolazione di cellule staminali pluripotenti che, differenziandosi, seguono una definita cascata proliferativa (**Figura 1**). Il processo di differenziamento passa attraverso gli stadi di cellula staminale pluripotente, progenitore, precursore ed infine cellula matura e differenziata. A livello di cellula staminale pluripotente la cellula può seguire due diverse cascate proliferative: la mielopoiesi che dà origine a globuli bianchi, globuli rossi e piastrine, e la linfopoiesi che dà origine a linfociti T, B e NK.

La leucemia può insorgere a diversi stadi della maturazione delle cellule del sangue a causa di alterazioni cromosomiche e molecolari dei meccanismi di crescita e differenziamento, che rendono così le cellule incapaci di svolgere la loro naturale funzione di difesa causando danni come anemia, emorragie e gravi infezioni, infiltrazione e danno di tessuti e organi (linfonodi, milza, cute, sistema nervoso centrale, scheletro).



**Figura 1.** Emopoiesi

L'insorgenza e lo sviluppo della leucemia deriva dall'acquisizione di un vantaggio proliferativo di un clone neoplastico nei confronti della normale emopoiesi. I meccanismi molecolari responsabili del processo, in gran parte noti, sono l'acquisizione di un oncogene per trasformazione di un proto-oncogene in oncogene e/o l'inattivazione di un gene oncosoppressore coinvolti nei meccanismi di trasduzione del segnale intracellulare, di riparazione del DNA, di regolazione del ciclo cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi.

Le leucemie possono essere mieloidi, linfoide, bifenotipiche o indifferenziate a seconda che colpiscano, rispettivamente, cellule già differenziate nella linea mieloide, linfoide, cellule che possiedono antigeni sia mieloidi sia linfoide, o cellule non ancora differenziate.

Le leucemie possono essere croniche o acute, a seconda della modalità di insorgenza dei sintomi e della progressione della malattia. Le leucemie croniche sono caratterizzate dalla proliferazione di cellule già differenziate, hanno un decorso lento e sono più frequenti nell'età adulta. Le leucemie acute sono dovute alla proliferazione di cellule immature non differenziate, hanno

esordio improvviso e decorso aggressivo. Rappresentano la forma più comune di neoplasia pediatrica e la causa primaria di morte dovuta a tumore nei bambini <sup>[4]</sup>.

## 1.2 Classificazione

Le leucemie sono suddivise in base a due classificazioni principali: la FAB (French-American-British) e quella più recente della WHO (World Health Organization).

Entrambe prendono in considerazione le caratteristiche morfologiche, citochimiche ed immunofenotipiche delle cellule neoplastiche per stabilire il loro lineage ed il loro grado di maturazione. La classificazione WHO integra altre informazioni rilevanti, come proprietà citogenetiche, genetico-molecolari e dati su precedenti mielodisplasie o terapie.

La classificazione FAB <sup>[5,6]</sup> considera le leucemie acute mieloidi (LAM) (**Tabella 1**) e linfoidi (LAL) (**Tabella 2, 3**).

La classificazione WHO suddivide le neoplasie ematologiche prima di tutto secondo il loro lineage: leucemie mieloidi, leucemie linfoidi, malattie dei mastociti e neoplasie degli istiociti (**Tabella 4**). All'interno di questa classificazione vengono ulteriormente suddivisi varianti e sotto-tipi <sup>[7,8]</sup>. 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.

Tipo FAB	Traslocazioni	Immunofenotipo	Geni coinvolti	Criteri per la diagnosi	Istochimica
<b>Indifferenziata M0</b>		Cellule senza maturazione citologica, con antigeni mieloidi (CD13, 33)			MP-
<b>Mieloblastica senza maturazione M1</b>	t(9;22)(q34;q11)	CD13 <sup>+</sup> , 33 <sup>+</sup> , 34 <sup>+</sup>	BCR, ABL	Blasti >90% cellule non-eritroidi, 10% di cellule in maturazione a granulociti o monociti.	MP+
<b>Mieloblastica con maturazione M2</b>	t(8;21)(q22;q22) t(3;21)(q26;q22)	CD13 <sup>+</sup> , 33 <sup>+</sup> , 34 <sup>+</sup>	ETO, AML1 EV11, AML1	Blasti 30-89% cell. non-eritroidi, >10% granulociti in maturazione, <20% cellule monocitiche.	MP+
<b>Promielocitica M3</b> (variante ipergranulare)	t(15;17)(q22;q11-12) t(11;17)(q23;q21)	CD13 <sup>+</sup> , 33 <sup>+</sup>	PML, RAR PLZF, RAR	<20% promielociti ipergranulari anormali. Corpi di Auer presenti.	MP+
<b>Promielocitica M3v</b> (variante ipogranulare)	t(15;17)(q22;q11-12)	CD2 <sup>+</sup>	PML, RAR	Promielociti con piccoli granuli citoplasmatici	MP+
<b>Mielomonocitica M4</b>	t(1;11)(q21;q23)* t(6;11)(q27;q23)* t(9;11)(p22;q23)* t(10;11)(p12;p23) t(11;19)(q23;p13.1) t(11;19)(q23;p13.3) inv(16)(p13;q22) t(16;16)(p13;q22)	CD13 <sup>+</sup> , 14 <sup>+</sup> , 15 <sup>+</sup> , 33 <sup>+</sup>	MLL	Promielociti con piccoli granuli citoplasmatici.	MP+
<b>Mielo-monocitica con eosinofilia M4Eo</b>				Eosinofili anormali con grandi granuli basofili e nucleo monolobato. Positivi alla cloroacetatoesterasi.	MP+ NSE+ Eos-PAS+
<b>Monocitica poco differenziata M5a</b>	11q23* (vedi M4)	CD4 <sup>+</sup> , 13 <sup>+</sup> , 15 <sup>+</sup> , 33 <sup>+</sup> , 64 <sup>+</sup> , DR <sup>+</sup>	MLL	M5a >80% delle cellule monocitiche sono monoblasti.	NSE+
<b>Monocitica ben differenziata. M5b</b>	11q23* (vedi M4)	CD4 <sup>+</sup> , 13 <sup>+</sup> , 15 <sup>+</sup> , 33 <sup>+</sup> , 11b <sup>+</sup> , 14 <sup>+</sup> , DR <sup>+</sup>	MLL	M5b <80% delle cellule monocitiche sono monoblasti.	NSE+
<b>Eritroleucemia M6</b> (spesso evolve a M1, M2 o M4)		Glicoforina A <sup>+</sup>		>30% cellule non-eritroidi sono blasti, ma >50% delle cellule del midollo sono eritroblasti.	Erythroblasts PAS+
<b>Megacariocitica M7</b>	t(1;22)(p13;q13)	CD41 <sup>+</sup> , 61 <sup>+</sup>		>30% cellule non-eritroidi sono megacarioblasti. Mielofibrosi.	Platelet perox+

**Tabella 1.** Classificazione FAB delle Leucemie Acute Mieloidi (LAM). 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 LAL, mentre la loro assenza non ha valore diagnostico.

Classificazione FAB	Dimensione cellulare	Cromatina nucleare	Nucleoli	Quantità di citoplasma	Basofilia del citoplasma	Vacuoli
<b>L1</b>	Piccole	Omogenea	Regolari	Scarsa	Leggera o moderata	Variabili
<b>L2</b>	Grandi, eterogenee	Eterogenea	Spesso grandi	Variabile, spesso abbondante	Variabile o intensa	Variabili
<b>L3</b>	Grandi, omogenee	Punteggiata ed omogenea	Prominenti	Moderatamente abbondante	Molto intensa	Spesso prominenti

**Tabella 2.** Classificazione FAB delle leucemie acute linfoblastiche in base alla morfologia.

LAL	Classificazione FAB	Criteri immunofenotipici	Anomalie citogenetiche	Geni coinvolti
<b>Pre-pre-B</b>	L1-L2	CD19, 22,135, 34,45,DR,Tdt	t(4;11)(q21;q23) alterazione 11q23	MLL/AF4 MLL/altri partner
	L1-L2	CD10,19, 22, 34,DR,Tdt	t(12;21)(p13;q22)	TEL/AML1
	L2-L1	CD10,19, 20, 22, 34, 45, 135 DR,Tdt	t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL
	L1-L2	CD10,19, 20, 22, 34, DR,Tdt	Iperdiploidi	
<b>Pre-B</b>	L1-L2	CD10,19, 20, 22, DR,Tdt	t(1;19)(q23;p13)	E2A/PBX1
<b>Pre-B/B</b>	L1	CD10,19, 20, 22, 45 DR,Tdt		
<b>B</b>	L3	Ig k o λ, CD19, 20, 22 DR	t(8;14)(q24;32)	Alterata regolazione MYC
			t(2;8)(q12;q24)	
			t(8;22)(q24;q11)	
<b>Pre-T</b>	L1	CD3, 7, TdT	t(1;14)(p32;q11)	Alterata regolazione TAL1 TAL2 LYL1
			t(1;7)(p32;q35)	
			t(7;9)(q34;q32)	
			t(7;19)(q34;p13)	
<b>T-intermedia</b>	L1	CD1a, 3, 2, 4, 5, 6, 7, 8 TdT	t(10;14)(q24;q11)	Alterata regolazione HOX11
<b>T-mature</b>	L1-L2	CD 3, 2, 4, 5, 6, 7, 8 TdT	t(7;10)(q35;q24)	Alterata regolazione HOX11 LMO1 LMO2 LMO2 LCK TAN1
			t(11;14)(p15;q11)	
			t(7;11)(q35;p13)	
			t(11;14)(p13;q11)	
			t(1;7)(p34;q34)	
t(7;9)(q34;q34)				

**Tabella 3.** Classificazione FAB delle leucemie acute linfoblastiche in base all'immunofenotipo ed all'analisi citogenetica.

<p><b>Myeloproliferative neoplasms (MPN)</b></p> <p>Chronic myelogenous leukemia, <i>BCR-ABL1</i>-positive</p> <p>Chronic neutrophilic leukemia</p> <p>Polycythemia vera</p> <p>Primary myelofibrosis</p> <p>Essential thrombocythemia</p> <p>Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified</p> <p>Mastocytosis</p> <p>Myeloproliferative neoplasms, unclassifiable</p> <p><b>Myeloid and lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and abnormalities of <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, or <i>FGFR1</i></b></p> <p>Myeloid and lymphoid neoplasms associated with <i>PDGFRA</i> rearrangement</p> <p>Myeloid neoplasms associated with <i>PDGFRB</i> rearrangement</p> <p>Myeloid and lymphoid neoplasms associated with <i>FGFR1</i> abnormalities</p> <p><b>Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)</b></p> <p>Chronic myelomonocytic leukemia</p> <p>Atypical chronic myeloid leukemia, <i>BCR-ABL1</i>-negative</p> <p>Juvenile myelomonocytic leukemia</p> <p>Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable</p> <p><i>Provisional entity: refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis</i></p> <p><b>Myelodysplastic syndrome (MDS)</b></p> <p>Refractory cytopenia with unilineage dysplasia</p> <p>Refractory anemia</p> <p>Refractory neutropenia</p> <p>Refractory thrombocytopenia</p> <p>Refractory anemia with ring sideroblasts</p> <p>Refractory cytopenia with multilineage dysplasia</p> <p>Refractory anemia with excess blasts</p> <p>Myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)</p> <p>Myelodysplastic syndrome, unclassifiable</p> <p>Childhood myelodysplastic syndrome</p> <p><i>Provisional entity: refractory cytopenia of childhood</i></p> <p><b>Acute myeloid leukemia and related neoplasms</b></p> <p>Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities</p> <p>AML with t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>APL with t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i></p> <p>AML with t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i></p> <p>AML with t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i></p> <p>AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); <i>FBM15-MKL1</i></p> <p><i>Provisional entity: AML with mutated NPM1</i></p> <p><i>Provisional entity: AML with mutated CEBPA</i></p>	<p>Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes</p> <p>Therapy-related myeloid neoplasms</p> <p>Acute myeloid leukemia, not otherwise specified</p> <p>AML with minimal differentiation</p> <p>AML without maturation</p> <p>AML with maturation</p> <p>Acute myelomonocytic leukemia</p> <p>Acute monoblastic/monocytic leukemia</p> <p>Acute erythroid leukemia</p> <p>Pure erythroid leukemia</p> <p>Erythroleukemia, erythroid/myeloid</p> <p>Acute megakaryoblastic leukemia</p> <p>Acute basophilic leukemia</p> <p>Acute panmyelosis with myelofibrosis</p> <p>Myeloid sarcoma</p> <p>Myeloid proliferations related to Down syndrome</p> <p>Transient abnormal myelopoiesis</p> <p>Myeloid leukemia associated with Down syndrome</p> <p>Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</p> <p><b>Acute leukemias of ambiguous lineage</b></p> <p>Acute undifferentiated leukemia</p> <p>Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged</p> <p>Mixed phenotype acute leukemia, B-myeloid, NOS</p> <p>Mixed phenotype acute leukemia, T-myeloid, NOS</p> <p><i>Provisional entity: natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma</i></p> <p><b>B lymphoblastic leukemia/lymphoma</b></p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS</p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities</p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged</p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22) <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i></p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy</p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy</p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32) <i>IL3-IGH</i></p> <p>B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i></p> <p><b>T lymphoblastic leukemia/lymphoma</b></p>
--	---

**Tabella 4.** Classificazione WHO delle leucemie <sup>[8]</sup>.

### 1.3 Incidenza

Secondo American Society of Cancer, nel 2007 (ultimo anno attualmente disponibile come statistica) ci sono stati più di 188.000 nuovi casi di leucemia nel mondo, con un'incidenza maggiore tra la popolazione maschile, che hanno portato a più di 100.000 decessi <sup>[9,10]</sup> (**Figura 2**).

Per quanto riguarda i pazienti pediatrici (0-18 anni), l'incidenza è valutata in 30-45 nuovi casi per milione all'anno. Negli Stati Uniti sono stati diagnosticati nel 2009 circa 3500 nuovi casi di leucemia acuta in bambini ed adolescenti con meno di 20 anni di età <sup>[9]</sup>, mentre in Italia sono stati circa 500 <sup>[11]</sup>; di questi, circa 2400 in USA e 400 in Italia hanno presentato una leucemia acuta linfoblastica (LAL) con un incremento annuo di incidenza dell'1%, ed i restanti hanno compreso soprattutto leucemie mieloidi acute (LAM).

Le leucemie costituiscono il 35% di tutte le forme tumorali nei pazienti pediatrici <sup>[1,4,12]</sup>; di queste, le LAL rappresentano l'80% delle leucemie acute del bambino, colpiscono soprattutto l'età neonatale e hanno un picco di incidenza intorno ai 4-5 anni di età e nella fase prepuberale <sup>[11-14]</sup>. Inoltre sono più comuni tra i maschi rispetto alle femmine. Le LAM rappresentano il 10% delle leucemie acute del bambino, più frequenti nei bambini di età inferiore a 1 anno, a incidenza costante fino ai 10 anni, con leggero aumento nell'adolescenza e stabilizzazione nell'età adulta, mentre si registra un progressivo aumento dell'incidenza dopo i 55 anni di età; il rapporto di incidenza tra maschi e femmine è approssimativamente 1:1 <sup>[11,12]</sup>. Il restante 10% delle leucemie pediatriche è dato da sindromi mieloproliferative quali la leucemia mieloide cronica (LMC), la leucemia mielo-monocitica giovanile (JMML) e sindromi mielodisplastiche (SMD).

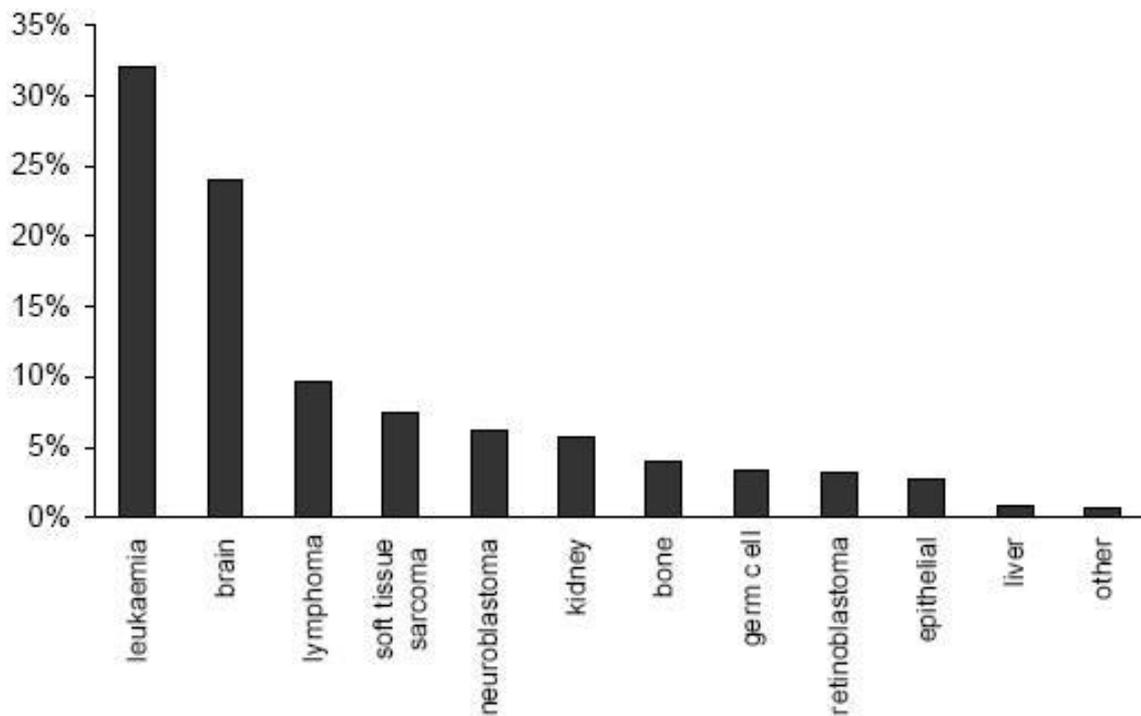


Fig. 1. Incidence of childhood cancer.

Figura 2. Distribuzione dei principali tumori pediatrici <sup>[3]</sup>.

## 1.4 Eziologia

L'eziologia delle leucemie è associata a molteplici fattori di rischio, sia genetici che ambientali <sup>[1,3,11,15,16]</sup>:

### a) Condizioni ereditarie e congenite predisponenti:

- mutazioni germinali (TP53, NF1, AT, ecc.) incidono per non più del 5% nello sviluppo di leucemia pediatrica;
- la Sindrome di Down aumenta considerevolmente il rischio di LAL e LAM: circa 1 su 95 bambini con sindrome di Down sviluppano LAM sottotipo M7 o LAL;
- nei gemelli la probabilità di sviluppare leucemia è di circa il 25% nei primi 5 anni di età;
- varianti polimorfiche dei geni coinvolti nel metabolismo, nella risposta immune e nella riparazione dei geni (es. NQ01, MTHFR, HLA Class II) possono essere correlati allo sviluppo di leucemie.

### b) Anomalie genetiche acquisite: traslocazioni, mutazioni, delezioni.

### c) Radiazioni ionizzanti, cosmiche (raggi $\gamma$ ) e terrestri, campi magnetici non-ionizzanti.

La probabilità di sviluppare leucemie in individui esposti a radiazioni ionizzanti per motivi diagnostici o terapeutici, ed in bambini nati da donne che durante la gravidanza sono state sottoposte a radiazioni ionizzanti, risulta rispettivamente 3-5 volte e 1,5-2 volte maggiore rispetto ad individui non esposti.

**d) Sostanze chimiche:**

- farmaci antiblastici (agenti alchilanti: ciclofosfamide, procarbazina, melphalan) sembrano responsabili dell'induzione di leucemie acute o di tumori cerebrali secondari in pazienti trattati per varie forme di neoplasie maligne in età pediatrica;
- sostanze chimiche in grado di legarsi al DNA (idrocarburi e benzene, solventi, cloramfenicolo, arsenati, pesticidi, gas di scarico) portano a mutazioni che possono attivare oncogeni o inattivare geni oncosoppressori. Possono anche attraversare la placenta e causare cancro in utero;
- consumo di fumo e alcol in gravidanza o in fase preconcipimento a danno delle cellule germinali.

**e) Virus leucemogeni:**

- retrovirus acuti che integrano il loro genoma in quello della cellula ospite;
- retrovirus cronici (es: HTLV, Human T cell Leucemia Virus, tra cui HIV Human Immunodeficiency Virus) che necessitano di una lunga latenza prima che la neoplasia si manifesti;
- EBV (Epstein Barr Virus) che provoca il linfoma di Burkitt.

## 1.5. Presentazione clinica e diagnosi

La proliferazione incontrollata della popolazione leucemica rispetto alle normali cellule del sangue porta ad una progressiva sostituzione del tessuto emopoietico normale con il tessuto neoplastico <sup>[1,3,11]</sup>.

La diagnosi di leucemia prevede un esame emocromocitometrico con formula leucocitaria e conta piastrinica del sangue periferico, e un'analisi del sangue midollare prelevato con ago aspirato per valutare la popolazione cellulare normale e leucemica <sup>[1,3,11]</sup>. In **Tabella 5** sono riportati i valori normali di emocromo. La quota di blasti normale in età pediatrica è del 5%. E' considerato sospetto un livello di blasti maggiore del 5% e diagnostico del >25% rispetto alla popolazione midollare.

	Formula normale
Globuli bianchi (WBC)	4-11 x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Globuli rossi (RBC)	4,6-6 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
Piastrine (Ptl)	140-440 x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Emoglobina (Hb)	14-18 g/dl
Ematocrito (HCT)	40-52%
Volume Cellulare Medio (MCV)	82-98 μm <sup>3</sup> o fl
Contenuto Cellulare Medio Hb (MCH)	25-34 pg
Concentrazione Cellulare Media Hb (MCHC)	32-36 g/dl
Ampiezza Media Distribuzione Globuli Rossi (RDW-CV)	11,5-14,5%
Volume Medio Piastrinico (MPV)	7,2-11,1 μm <sup>3</sup>
Emazie ipocromiche	0-2,5%
<b>Formula leucocitaria</b>	
% Granulociti Neutrofili	30-60%
Numero Granulociti Neutrofili	1,8-8 x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
% Linfociti	25-55%
Numero Linfociti	1-4,5 x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
% Monociti	4-11%
Numero Monociti	0,1-1 x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
% Granulociti Eosinofili	0-8%
Numero Granulociti Eosinofili	0-0,8 x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
% Granulociti basofili	0-2%
Numero Granulociti Basofili	0-0,2 x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>

**Tabella 5.** Valori emocromocitometrici delle cellule emopoietiche normali.

L'analisi cellulare prevede un esame citomorfologico e citochimico, la tipizzazione immunofenotipica, lo studio molecolare e citogenetico dei blasti leucemici per la stadiazione secondo i criteri FAB e WHO (**Tabelle1-4**) [5-8]. Una valutazione accurata è fondamentale per poter assicurare una corretta distinzione non solo tra leucemie acute mieloidi e linfoblastiche, ma anche tra diversi sottotipi di LAM (ad esempio, per identificare linea monocitaria o i promielociti) e per instaurare la terapia più adeguata.

I segni tipici di leucemia sono usualmente anemia, trombocitopenia, e neutropenia, che riflettono la non funzionalità di una normale emopoiesi [1,3,11]. Si manifestano anche pallore, affaticamento, dolore alle ossa, petecchie, porpore, emorragie e febbre. I sintomi possono precedere anche di 2-6 settimane il quadro ematologico conclamato. Se si ha anche interessamento extramidollare si sviluppano linfoadenopatia, epatomegalia e splenomegalia. Sono anche presenti sintomi aspecifici che possono indurre a pensare ad altre malattie infantili sia maligne, come linfoma non-Hodgkin, neuroblastoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, che non, come artrite reumatoide giovanile, osteomielite, infezioni virali (mononucleosi, linfocitosi, pertosse, citomegalovirus) [1,3,11].

Con l'esame emocromocitometrico è possibile valutare la cellularità del sangue, che è il più importante fattore prognostico di leucemia [1,3,11].

Il numero di leucociti è elevato in pazienti con leucemia (in media  $24 \times 10^9/\text{ml}$ ), ma il numero di neutrofili maturi e funzionali è  $<1000/\text{ml}$  ed è un fenomeno frequente ed associato a rischio di infezioni.

L'anemia (emoglobina  $<10\text{g/dl}$ ) si ha in circa l'80% dei pazienti.

La trombocitopenia ( $<100000$  piastrine/mm<sup>3</sup>) si ha in circa il 75% dei pazienti e causa emorragie a livello della mucosa orale ed intestinale.

Per dare diagnosi definitiva di leucemia è necessario effettuare un prelievo di sangue midollare con ago aspirato e verificare che ci siano  $>25\%$

di blasti, anche se un valore già superiore al 5% è altamente indicativo di leucemia.

L'esame citochimico deve essere eseguito su strisci di sangue midollare per poter distinguere appunto leucemie acute mieloidi e linfoblastiche <sup>[1,3,11]</sup>. Può essere sufficiente l'esame morfologico o fotochimico, ma vengono spesso utilizzate specifiche colorazioni istochimiche per differenziare la diagnosi in LAM o LAL (mieloperossidasi, Sudan black B, periodic acid-Shiff, TdT).

Lo studio dell'immunofenotipo viene effettuato tramite analisi citofluorimetrica utilizzando anticorpi monoclonali (MoAbs) specifici per i diversi lineage, per distinguere gli antigeni di superficie delle cellule leucemiche LAM o LAL ed ha un ruolo complementare rispetto alla diagnosi morfologica e citochimica <sup>[1,3,11]</sup>.

Le anomalie cromosomiche possono essere individuate mediante analisi citogenetica convenzionale o FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Recentemente, si sono rese disponibili metodiche avanzate di analisi del genoma, che consentono di evidenziare da un lato, aberrazioni strutturali e polimorfismi genici (SNP-arrays), e, dall'altro, il profilo di espressione di tutti i geni del genoma umano (gene expression arrays).

Circa il 70-80% di pazienti con leucemia presenta anomalie genetiche, soprattutto aneuploidie, traslocazioni e delezioni cromosomiche, ma anche mutazioni geniche puntiformi. E' importante la distinzione delle diverse aberrazioni cromosomiche in quanto portano a diversi sottotipi leucemici con caratteristiche prognostiche diverse e che rispondono diversamente alle diverse terapie.

Per quanto riguarda le LAL, circa il 30% delle aberrazioni cromosomiche sono ricorrenti, e le più frequenti sono <sup>[3,11-14]</sup>:

- t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1 riscontrata in circa il 20-25% dei casi, associata a LAL pre-B, è tendenzialmente associata ad una prognosi favorevole grazie alla sensibilità al trattamento con asparagi nati;

- t(1;19)(q23;p13) E2A-Pbx1 in circa 5%, tipica del sottotipo pre-B, non sembra avere un impatto prognostico;
- t(9;22)(q34;q11) BCR-ABL (cromosoma Philadelphia) nel 2%, associata ad una prognosi meno favorevole;
- t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4 nel 2%, associata ad una prognosi meno favorevole;
- altre traslocazioni 11q23/MLL, predispongono ad una prognosi peggiore nonostante si utilizzino protocolli disegnati specificatamente per questo sottogruppo di bambini affetti da LAL;
- l'iperdiploidia (>50 cromosomi), presente nel 25-30% dei casi, è associata a prognosi favorevole grazie alla risposta alla terapia con metotrexato;
- le trisomie 4,10 e 17 sono associate a prognosi favorevole.

Altri parametri associati alla prognosi di LAL sono:

- conta dei globuli bianchi  $> 50 \times 10^9/l$ : associata a prognosi sfavorevole;
- età  $> 10$  anni alla diagnosi.

Per quanto riguarda le LAM, la traslocazione t(8;21)(q22;q22) AML1-ETO, e/o le anomalie CBF $\beta$  inv16(p13;q22) o t(16,16)(p13;q22) CBF $\beta$ -MYH11 sono associate a prognosi favorevole <sup>[3,11,12,15]</sup>. Anche il sottotipo M3 o M3v o leucemia promielocitica acuta (acute promyelocytic leukemia, APL) con traslocazione t(15;17)(q22;q11-12) PML-RAR $\alpha$  ha valore prognostico positivo grazie al trattamento con protocolli chemioterapici che prevedono l'utilizzo intenso e protratto di acido all-trans retinoico (ATRA).

Un gruppo di rischio intermedio è caratterizzato da trisomia 8, trisomia 21, traslocazione t(6;9)(p23;q34) DEK-CAN, mutazioni o internal tandem duplication di FLT3, amplificazioni di MLL.

Invece, le anomalie con monosomia del cromosoma 7, del(7), del(11) o cariotipo complesso hanno prognosi particolarmente sfavorevole.

Le traslocazioni che coinvolgono 11q23/MLL sono considerate un sotto gruppo a parte, hanno prognosi migliore sia rispetto alle LAM senza traslocazioni 11q23/MLL, sia rispetto alle LAL con traslocazioni 11q23/MLL.

Altri parametri associati alla prognosi di LAM sono:

- età: influenza negativamente la prognosi per le forme che compaiono sotto l'anno di vita;

- razza: quella caucasica ha un decorso migliore rispetto a quella africana.

- conta dei globuli bianchi: il numero dei globuli bianchi all'esordio appare essere inversamente correlato alla probabilità di sopravvivenza. Sono definite iperleucocitiche la forma con GB > 200.000/ $\mu$ l.

E' necessario inoltre valutare la Malattia Minima Residua (MMR, o Minimal Residual Disease, MRD), cioè il valore delle cellule leucemiche rimaste durante o dopo terapia nel contesto di decine di migliaia di cellule normali di midollo osseo, quindi in fase di remissione ematologica convenzionale [3,11-14].

Mentre la definizione di remissione ematologica corrisponde alla presenza di un numero di blasti leucemici midollari <5% in un aspirato midollare di controllo, a livello molecolare ed immunofenotipico si utilizzano rispettivamente metodiche di PCR quantitativa che valutano la presenza di specifici riarrangiamenti clonali dei geni per T-cell Receptor (TcR) e per le Immunoglobuline (Ig), o la valutazione citofluorimetrica multiparametrica di fenotipi aberranti.

## 1.6. Terapia

### 1.6.1 LAL

Fino agli anni '60 le LAL erano considerate incurabili e trattate con una terapia palliativa, di contenimento, che si limitava ad un prolungamento della sopravvivenza, basata su uno steroide ed un antiblastico (Vincristina, o 6-Mercaptopurina, o Ametopterina), riservando un secondo antiblastico alla comparsa della recidiva, ritenuta peraltro ineluttabile <sup>[3]</sup>.

A metà degli anni '60 è stata introdotta in maniera rivoluzionaria la polichemioterapia, basata sull'associazione di più antiblastici con tempistiche specifiche, che ha portato la percentuale di sopravvivenza a valori superiori all'80% nei protocolli utilizzati a livello internazionale <sup>[11]</sup>.

Alla fine degli anni '80, in Italia sono stati attivati in successione i protocolli AIEOP LLA 88, 91, 95, 2000 ed R2006, che contengono gli elementi fondamentali riportati in **Tabella 6** <sup>[11]</sup>.

Fase	Trattamento
Prefase steroidea	Prednisone (PDN) per 7 giorni. Metotrexato intratecale (MTX-IT). Valutazione dei blasti periferici al giorno 8 per definire i casi PPR (Prednisone Poor Response > 1.000 blasti/mm <sup>3</sup> ) con prognosi meno favorevole.
Induzione della remissione ("Protocollo Ia")	Steroide, Vincristina (VCR), Daunoblastina/Daunomicina (DNM), Asparaginasi (ASP).
"Protocollo Ib"	Ciclofosfamide (CPM), Citarabina (ARA-C), 6-Mercaptopurina (6-MP).
Consolidamento	6-MP e Methotrexate (2-5 gr/m <sup>2</sup> ) ogni 2 settimane per 4 dosi.
"Protocollo M"	Methotrexate ad alte dosi (in generale a 5 gr/m <sup>2</sup> , più di recente anche a 2 gr/m <sup>2</sup> ) somministrato ogni 2 settimane per 4 volte.
Reinduzione ("Protocollo II")	Farmaci utilizzati nel Protocollo Ia e Ib, sostituendo il PDN con il Desametasone (DXM), e la DNM con l'Adriablastina (ADM).
Terapia di mantenimento	6-MP e MTX, per un totale di 24 mesi.
Profilassi al Sistema Nervoso Centrale (SNC)	MTX-IT ripetuto durante tutto l'arco del trattamento. La radioterapia sul SNC è stata prevista quasi esclusivamente nei casi ad alto rischio (circa il 10% dei casi) e/o con coinvolgimento SNC all'esordio.

**Tabella 6.** Protocolli terapeutici per LAL <sup>[11]</sup>.

Negli ultimi 20 anni, un contributo importante è venuto dal trapianto di cellule staminali (TCSE), nelle forme di LAL resistenti alla terapia di induzione o dopo recidiva di malattia <sup>[17]</sup>. I risultati sono in continuo miglioramento ed evidenziano la possibilità di trattare con successo una discreta percentuale di casi a prognosi particolarmente severa.

Sono inoltre in atto studi per sviluppare approcci alternativi di terapia cellulare, immunoterapia o farmaci ad azione mirata a livello molecolare per il trattamento di pazienti pediatrici affetti da forme di leucemia ad alto rischio non responsivi alle terapie tradizionali, soprattutto nel contesto delle ricadute post-trapianto di midollo osseo.

La sopravvivenza delle LAL a 5 anni per pazienti fino ai 15 anni è attualmente superiore all'80%, mentre è più bassa per pazienti tra 15 e 19 anni, ma risulta comunque il migliore incremento nei dati di sopravvivenza dato che, come riportato precedentemente, fino agli anni '60 le LAL si ritenevano una malattia incurabile <sup>[3,11-14]</sup>. Questo risultato è stato ottenuto essenzialmente grazie a studi randomizzati condotti prima a livello nazionale e, dai primi anni '80, nel contesto di una collaborazione internazionale <sup>[11]</sup>.

### 1.6.2 LAM

Il cardine della terapia della LAM è rappresentato dalla sistematica somministrazione di una polichemioterapia che mira essenzialmente al controllo della malattia midollare e sistemica, eventualmente integrata, in rapporto alla fascia di rischio, dal trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE) allogenico od autologo (**Tabella 7**) <sup>[3,11,12,15]</sup>.

Fase	Trattamento
Chemioterapia di induzione	Citosina arabinoside (ARA-C) e antraciline (daunorubicina, idarubicina), in combinazione con etoposide (VP-16) e/o tioguanina (6-TG) e talora corticosteroidi (desametasone). Remissione completa (RC) 75-90%.
Profilassi SNC	somministrazione intratecale di ARA-C
Terapia di consolidamento post-remissionale	Chemioterapia addizionale a cicli ripetuti (ARA-C variamente combinata a farmaci già utilizzati in induzione) oppure chemioterapia ad alte dosi seguita da TCSE allogenico (midollo osseo da donatore HLA compatibile, sangue periferico, sangue placentare) od autologo (midollo osseo, sangue periferico). Prolungamento e la stabilizzazione della RC.
Terapie di supporto	Terapia del dolore. Allopurinolo contro l'iperuricemia. Correzione dei deficit elettrolitici. Adeguato apporto nutritivo. Catetere venoso centrale. Emoderivati e farmaci antifibrinolitici contro la CID (coagulazione intravascolare disseminata). Fattori di crescita, quali granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) o granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) per ridurre la tossicità associata alla severa immunosoppressione.

**Tabella 7.** Protocolli terapeutici per LAM <sup>[11]</sup>

La sopravvivenza a 5 anni di pazienti fino ai 19 anni risulta inferiore al 50%. La percentuale di remissione totale in pazienti dai 0 ai 15 anni, risulta infatti essere del 90%, con una percentuale di events free survival (EFS) a 5 anni del 53%, mentre la frequenza delle morti precoci (nelle prime 6 settimane di terapia) è del 7,9% <sup>[11,17]</sup>.

Le recidive avvengono per circa il 50% nel primo anno, e quasi tutte entro il 5° anno, con una probabilità di sopravvivenza che arriva al 10% per quelle precoci (entro l'anno), e al 40% per quelle tardive (dopo l'anno). Infatti, la malattia recidivata/refrattaria resta la causa di morte principale nei bambini con LAM. La sede più frequentemente colpita è il midollo.

Il 10-50% dei pazienti lungosopravvivenenti dopo LAM o altre sindromi mieloproliferative presenta, in conseguenza del trattamento ricevuto, una serie di effetti collaterali a lungo termine, tra cui, in ordine di frequenza, anomalie dell'accrescimento, neurocognitive, endocrinopatie, infertilità, graft-versus-host disease cronica, seconde neoplasie maligne ed anomalie cardiache.

## 2. Il gene MLL

### 2.1 Ruolo di MLL nello sviluppo e nell'ematopoiesi embrionale

La regione cromosomica 11q23 contiene il gene MLL, acronimo di “Myeloid/Lymphoid Leukemia” o “Mixed Lineage Leukemia”, poiché il gene MLL è stato trovato mutato in LAL, LAM ed in leucemie scarsamente differenziate o bifenotipiche [18,19]. Il gene MLL è indicato anche come ALL-1, poiché è stato identificato per la prima volta in un caso di leucemia acuta linfoblastica, e come HRX e HTRX (“homolog of trihorax”), per la sua omologia con il gene “Trithorax” di *Drosophila* [20-24].

MLL è un regolatore dell'ematopoiesi, in particolar modo nello sviluppo embrionale [24,25]. MLL è espresso ad alti livelli nelle cellule mieloidi maggiormente differenziate e nei macrofagi, è invece espresso a livelli inferiori nelle prime cellule progenitrici emopoietiche e nei linfociti T e B; non è invece espresso nelle cellule eritroidi [24,25].

Topi con una mutazione omozigote per MLL (MLL<sup>-/-</sup>) muoiono nel periodo embrionale, mostrando diversi difetti nello sviluppo [26-28]. Altri studi effettuati su topi knock-out per *MLL* wild-type, mostrano che i principali bersagli dell'azione di MLL sono i geni *homeobox* (HOX), geni omeotici coinvolti in molti processi dello sviluppo, con il risultato che MLL regola positivamente i geni HOX, influenzandone il mantenimento piuttosto che l'attivazione l'ematopoiesi [29-32].

I geni HOX sono espressi anche nel tessuto emopoietico, in particolare è stato mostrato che cellule in varie fasi del differenziamento emopoietico presentano differenti patterns di espressione dei geni HOX [33].

I geni HOX codificano per un gruppo di fattori di trascrizione che regolano la segmentazione corporea durante lo sviluppo embrionale; inoltre regolano anche l'attivazione della differenziazione delle cellule staminali

ematopoietiche, dei progenitori mieloidi e linfoidi nei lineage specifici. Infatti l'espressione di vari geni HOX è maggiore in cellule progenitrici emopoietiche indifferenziate (CD34<sup>+</sup>) ed è diminuita durante la differenziazione in cellule ematiche mature. Un normale sviluppo corporeo nel tempo richiede continuamente l'espressione di ognuno dei geni HOX <sup>[34]</sup>.

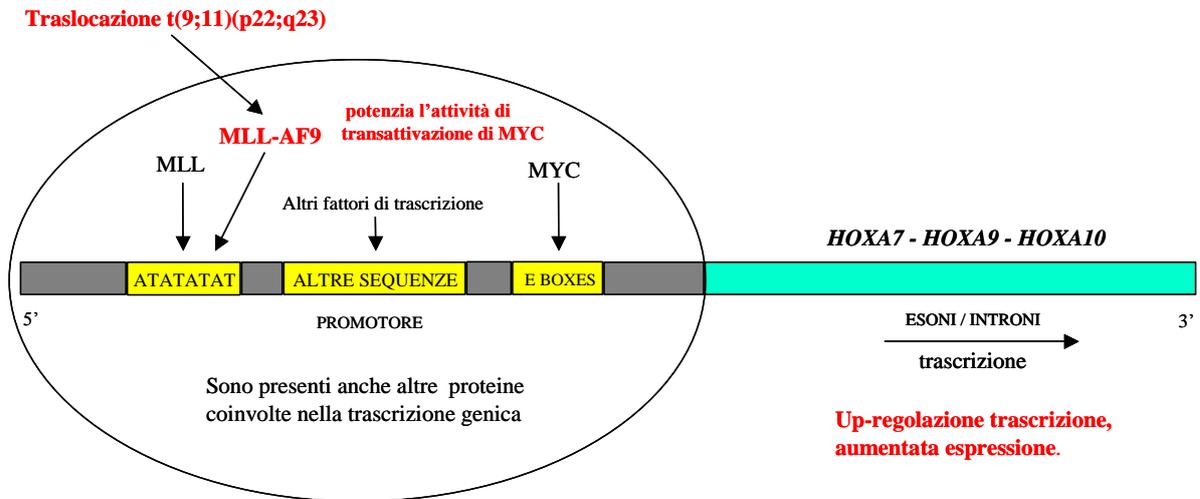
Una deregolazione della espressione dei geni HOX può determinare un difettivo controllo sullo sviluppo e sulla crescita cellulare, e può contribuire ad una varietà di disordini, comprese le neoplasie <sup>[35]</sup>. In seguito alle traslocazioni a carico di MLL, la proteina di fusione non può più svolgere la sua funzione regolatoria e diviene capace di alterare il pattern di espressione dei geni HOX.

Anche alcune proteine chimeriche derivanti da traslocazioni 11q23/MLL possono influenzare l'espressione dei geni HOXA. È stato dimostrato che in normali progenitori emopoietici l'espressione di diverse proteine chimeriche di MLL, come MLL-AF9, MLL-ENL, MLL-AF6, MLL-CBP, MLL-ELL e MLL-AF10, induce una up-regolazione di geni HOXA <sup>[36,37]</sup>. Per esempio, l'oncoproteina MLL-AF9 induce una up-regolazione dell'espressione di HOXA5, -A6, -A7, -A9 e -A10 <sup>[38]</sup> ed anche di MEIS1, che è un cofattore dei geni HOX <sup>[37]</sup>, mentre l'oncoproteina MLL-ENL attiva la trascrizione legandosi a vari promotori, tra cui anche quello di HOXA7 <sup>[34,39]</sup>.

Questi dati indicano che le proteine chimeriche di MLL possono disregolare l'espressione di specifici geni HOXA e ciò potrebbe favorire la trasformazione leucemica.

Oltre a disregolare l'espressione dei geni HOXA, le proteine chimeriche di MLL disregolano anche la funzione di altre proteine. Infatti, è stato riportato 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 del sistema emopoietico. La funzione di MYC è implicata in vari processi cellulari, tra cui crescita,

proliferazione, perdita del differenziamento, apoptosi ed adesione cellulare  
(Figura 3) [40,41].



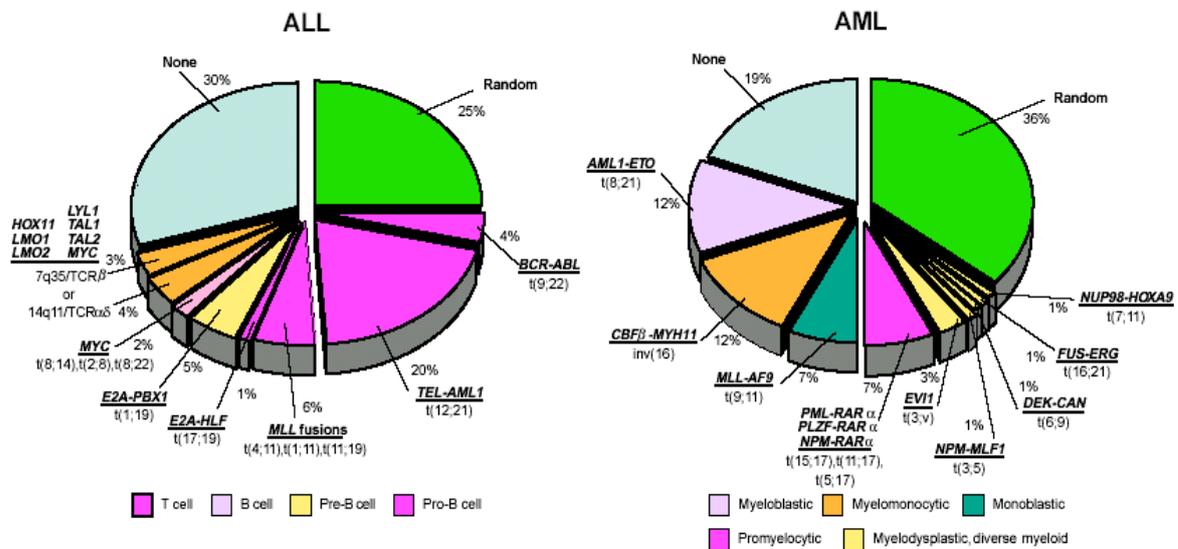
**Figura 3.** Schema dell'ipotetica regolazione trascrizionale dei geni HOXA (dedotto dai dati di letteratura riportati nel testo). Nel complesso trascrizionale, che si assembla sui promotori dei geni HOXA, sono presenti anche le proteine MLL, MYC e, in seguito alla traslocazione t(9;11)(p22;q23), anche la proteina chimerica MLL-AF9 che può disregolare l'espressione dei geni HOXA.

## 2.2 Espressione di MLL *wild-type*

A livello cellulare, la proteina MLL *wild-type* è ampiamente espressa nella maggior parte dei tipi cellulari, incluse le cellule ematopoietiche. Anche a livello tissutale tale proteina è espressa in molti tessuti (cervello, colon, fegato, milza, timo, tonsille, rene, cuore, tiroide, polmone, e testicoli), con una presenza maggiore nella corteccia cerebrale, tiroide, rene e tessuti linfoidei <sup>[42]</sup>. Studi immunohistochimici hanno rivelato che sia la proteina MLL *wild-type* che le proteine di fusione che coinvolgono MLL si 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 di dimensione, morfologia e numero variabili <sup>[42-44]</sup>.

### 2.3 Leucemie con traslocazione del gene MLL

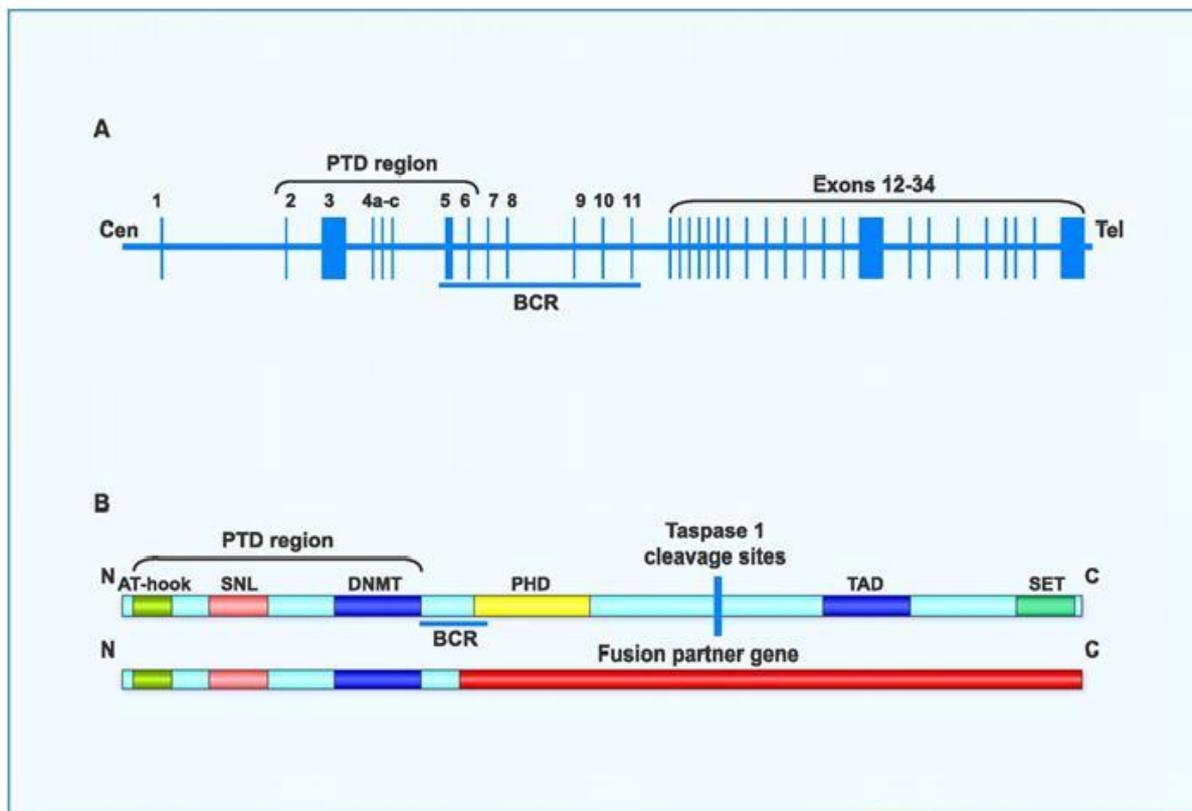
Leucemie acute pediatriche che presentano aberrazioni cromosomiche quali traslocazioni, delezioni o duplicazioni a carico del cromosoma 11q23 sono associate con una prognosi sfavorevole. Le leucemie con riarrangiamenti cromosomici di 11q23 esprimono caratteristiche peculiari rispetto alle leucemie acute sia mieloidi che linfoblastiche, tanto che vengono considerate una nuova entità unica e indipendente [45-48]. Alterazioni di 11q23 si riscontrano nel 10-15% di LAM pediatriche (1-18 anni) e 8-10% adulte, nel 5-10% di LAL pediatriche e adulte, e nel 60-70% di leucemie in età inferiore a 12 mesi (infant leukemia), sia LAL sia LAM [49,50]. I riarrangiamenti 11q23 sono rilevati con un'alta frequenza (70%-90%) anche in leucemie acute secondarie, che si originano dopo un trattamento di una neoplasia primaria con radioterapia o chemioterapia [51-56,11], in particolare dopo l'utilizzo di agenti alchilanti o inibitori della topoisomerasi II, un bersaglio comune di molti farmaci antineoplastici (Figura 4) [57].



**Figura 4.** Distribuzione degli oncogeni generati da traslocazioni cromosomiche nelle leucemie di bambini e giovani adulti. “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 [57].

## 2.4 Struttura del gene e della proteina MLL

Il gene MLL è stato isolato nel 1991, si trova sul cromosoma 11, in particolare sulla banda 23 del braccio corto q (11q23), e si estende per circa 90 Kb; tale gene consiste di 36 esoni di dimensioni che variano tra 65 bp e 4249 bp (**Figura 5**) [22-24,55]. Il gene MLL codifica una proteina di 3968 aminoacidi (AA) con una massa molecolare di 431 KDa, che contiene diversi motivi strutturali.



**Figura 5.** (A) Organizzazione del gene MLL, (B) proteina e prodotti dei riarrangiamenti di MLL. BCR: *Breakpoint region*, regione di rottura; A-T, dominio *AT hook*; SNL: *subnuclear localization*, sequenze di localizzazione nucleare; DNMT: *DNA metiltrasferase*; PHD: *plant homeodomain*, dominio *zinc finger*; TAD: *transactivation domain*; SET, regione di maggiore omologia con *Trithorax* e altre proteine con dominio SET, con un probabile ruolo nel rimodellamento della cromatina [55].

#### **2.4.1 Motivi strutturali della porzione amino-terminale (N-terminale)**

##### **a) Motivi “AT hook” (Esone 3, AA 170-182, 217-228, 301-309).**

Nella parte iniziale della regione N-terminale vi sono 3 brevi motivi detti “AT hook”, codificati dall’esone 3 e formati da aminoacidi basici conservati. I motivi “AT hook” si legano al solco minore della doppia elica del DNA, ricco di AT, che si presenta con una conformazione distorta o cruciforme <sup>[58]</sup>, ed interagiscono con diverse proteine con attività di regolazione trascrizionale, tra cui SET-1 (template-activating factor [TAF]-1 $\alpha$ ), TAF-1 $\beta$  e GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible protein 34).

##### **b) Sequenze di localizzazione nucleare: SNL1 e SNL2 (subnuclear localization).**

Queste due brevi sequenze conservate dette SNL1 e SNL2 dirigono la proteina MLL (*wild-type* e di fusione) nel nucleo e in distinti domini sub-nucleari. Entrambe queste sequenze sono altamente conservate e si trovano anche nella proteina TRX di *Drosophila*.

##### **c) Dominio DNMT (DNA methyltransferase) (Esoni 4b-5, AA 1153-1219).**

Sempre nella porzione N-terminale di MLL è presente una seconda regione ricca di cisteine, detta motivo “CXXC”, che riconosce sequenze di DNA CpG non metilate ed ha attività di repressione della trascrizione quando legato al DNA in vicinanza di un promotore <sup>[58,59]</sup>. Il dominio CXXC viene anche legato dalla proteina istone deacetilasi (HDAC1) che ne media parzialmente l’attività; questo legame può essere potenziato dall’interazione della proteina Cyp33 con l’adiacente dominio di MLL PHD <sup>[60]</sup>.

Studi strutturali e funzionali hanno rivelato che sia i motivi AT hook che il dominio DNMT sono cruciali per l'oncogenesi <sup>[59]</sup>. Nelle traslocazioni cromosomiche, il dominio soppressore di MLL è mantenuto nella proteina di fusione ed è richiesto per la sua attività trasformatrice <sup>[60]</sup>. Anche le proteine di gruppo Polycomb: HPC2 e BMI-1 e il coinibitore C-terminal binding protein si legano al dominio di repressione di MLL.

La porzione N-terminale di MLL è mantenuta in tutte le proteine di fusione generate dalla traslocazione ed è richiesta per la capacità di trasformazione.

## **2.4.2 Motivi strutturali della porzione carbossi-terminale (C-terminale)**

### **a) Domini zinc finger PHD (plant homeodomain) e Bromodomain homology.**

I motivi PHD zinc finger (a dito di zinco) sono quattro regioni conservate tra MLL e TRX, ricorrenti soprattutto nelle proteine componenti la cromatina e/o regolatrici dell'attività genica <sup>[61]</sup>. I motivi PHD fingers hanno omologia con quelli RING fingers che si trovano nelle proteine che compongono la cromatina e che sono coinvolte nella interazione proteina-proteina; è stato quindi ipotizzato che, diversamente dai classici zinc finger, che mediano il legame al DNA di molti fattori di trascrizione, i motivi PHD di MLL sembrano funzionare nelle interazioni proteina-proteina <sup>[61]</sup>. Il terzo e il quarto PHD fingers hanno una estremità N-terminale comprendente coppie di cisteine (CXXC) e/o coppie di istidine-cisteine (HXXC) che possono formare un ulteriore zinc finger o che possono formare una struttura più complessa con l'associazione del sito PHD fingers. Questi due fingers sono detti ePHD fingers (extended PHD fingers) <sup>[62]</sup>. Tra il terzo ed il quarto motivo zinc finger c'è anche una regione relativa al bromodomain, che è presente in varie proteine cromatiniche e si lega ad istoni lisin-acetilati; ciò suggerisce che questa parte di MLL può interagire preferenzialmente con un istone acetilato o altre proteine acetilate.

### **b) Transactivation domain (TAD).**

La regione TAD è in grado di attivare la trascrizione di un gene reporter quando tale regione è espressa in fusione con il dominio che lega il DNA GAL4 <sup>[63]</sup>. Quindi MLL contiene sia un dominio con attività di repressione trascrizionale che un forte dominio di trans-attivazione, che interagisce anche con il co-attivatore proteico CBP.

### **c) SET domain.**

Questo dominio è stato riscontrato in famiglie di proteine che hanno la funzione di mantenere, durante lo sviluppo, il pattern specifico di espressione genica dopo l'inizio della trascrizione. Le due maggiori famiglie di proteine contenenti domini SET, il cluster proteico delle famiglie Trithorax (trx-G) e quello delle famiglie Polycomb (Pc-G), sono proteine cromatina-associate che agiscono in modo antagonista sulla alterazione della struttura della cromatina per promuovere o reprimere la trascrizione, rispettivamente <sup>[64]</sup>. Il dominio SET di MLL rivela un'intrinseca attività "istone metiltrasferasi" (HMT) <sup>[65]</sup> poiché è specificamente in grado di metilare la lisina 4 dell'istone 3 (H3K4), prerogativa che costituisce un marchio epigenetico tipicamente associato ad una cromatina trascrizionalmente attiva <sup>[66]</sup>. Da vari studi sembra che le proteine con dominio SET possano avere un ruolo nei complessi che attivano o reprimono la cromatina in specifiche regioni cromosomiche.

Nelle traslocazioni 11q23 la porzione C-terminale viene del tutto persa.

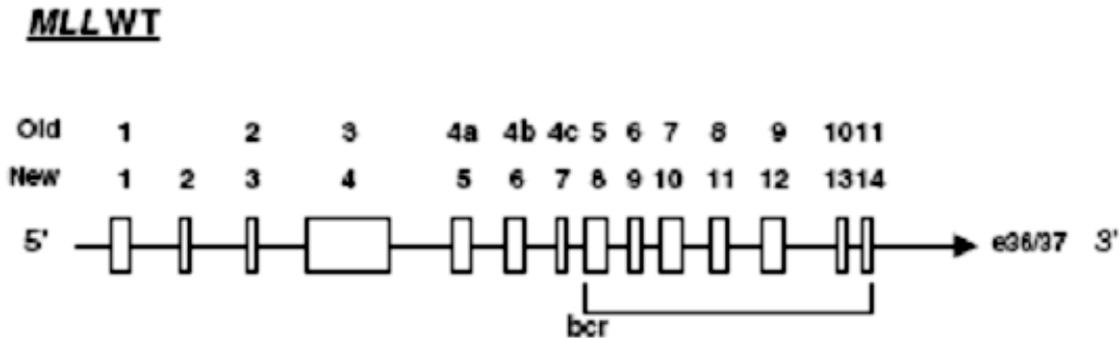
### 2.4.3 Processamento post-traduzionale della proteina MLL

È stato dimostrato che la proteina MLL viene divisa, *in vivo*, in due frammenti <sup>[67]</sup>: uno N-terminale (MLL<sup>N</sup>) di circa 320 KDa ed uno C-terminale (MLL<sup>C</sup>) di circa 180 KDa <sup>[55]</sup>. Il processamento di MLL avviene in siti di clivaggio conservati tra le regioni PHD e TAD. Dopo che MLL<sup>N</sup> e MLL<sup>C</sup> sono generati da taglio proteolitico, essi restano associati non covalentemente a formare un complesso proteico. L'interazione tra MLL<sup>N</sup> e MLL<sup>C</sup> è mediata dai motivi FYRN e FYRC più il dominio SET. Anche TRX possiede i motivi FYRN e FYRC. Il processamento di MLL avviene molto presto, entro poche ore dalla traduzione. In seguito al processamento, MLL<sup>C</sup> è fosforilato da meccanismi sconosciuti; la formazione di un complesso MLL<sup>N</sup>/MLL<sup>C</sup> sembra essere necessaria per la fosforilazione di MLL<sup>C</sup>. Le conseguenze funzionali della fosforilazione di MLL<sup>C</sup> non sono conosciute.

Si pensa che il processamento di MLL possa regolare le sue proprietà trascrizionali, che sembrano essere bifunzionali. MLL<sup>N</sup> contiene i motivi AT-hook ed il dominio MT e ha attività di repressione trascrizionale. Invece, MLL<sup>C</sup> ha forti proprietà di trans-attivazione <sup>[67]</sup>. Il processamento quindi divide MLL in due frammenti che interagiscono in modo non-covalente e possiedono opposte proprietà trascrizionali. La proteina MLL intatta, come complesso di MLL<sup>N</sup> e MLL<sup>C</sup>, mostra attività intermedia, che continua ad avere una moderata attività di repressione trascrizionale <sup>[67]</sup>. Questi dati suggeriscono che la relativa stechiometria di MLL<sup>N</sup> e MLL<sup>C</sup> può modulare lo stato di espressione dei geni target di MLL.

#### 2.4.4 Breakpoint region

Nella regione genica che codifica la porzione N-terminale di MLL, tra gli esoni 5 e 11 secondo la vecchia nomenclatura, 8 e 14 secondo la nuova nomenclatura [68] (**Figura 6**), per una lunghezza di circa 8,35 Kb, si trova una regione detta *breakpoint cluster region* (BCR) che è frequentemente colpita da eventi di rottura. A livello molecolare i punti di rottura sono in sequenze introniche, ed in particolare dentro o vicino a sequenze dette “ripetizioni Alu”. La porzione che codifica per la regione N-terminale, a seguito di rottura, subisce traslocazioni e fusioni con altri geni, detti geni partner di fusione, e insieme generano un gene chimera che, trascritto e tradotto, produce una proteina di fusione oncogenica, comprendente la porzione N-terminale di MLL e la C-terminale del gene partner <sup>[55,69]</sup>.



**Figura 6.** Vecchia e nuova nomenclatura degli esoni della regione 5' del gene di MLL Wild-type. [68].

Sono attualmente note più di 60 associazioni cromosomiche diverse del gene *MLL* e sono stati già analizzati e clonati a livello molecolare più di 30 geni partner (**Figura 7, Tabella 8**) <sup>[70,71]</sup>.



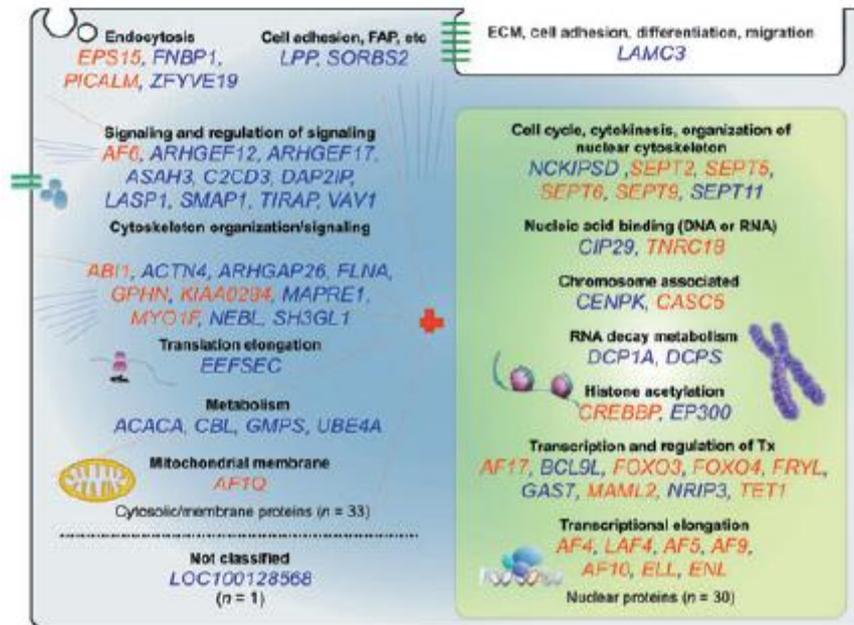
No.	Cytogenetic abnormality	Breakpoint	Partner gene	Reference <sup>a</sup>	Leukemia type
1	t(1;1)(p32;q23)	1p32	EPS15/AF1P	Bernard <i>et al.</i> (1994)	ALL, AML, CML
2	t(1;1)(q21;q23)	1q21	MLLT1/AF1Q	Tse <i>et al.</i> (1995)	AML
3	t(2;1)(q11.2~q12;q23)	2q11.2~q12	AFF3/LAF4	von Bergh <i>et al.</i> (2003)	ALL
4	t(3;1)(q37;q23)	2q37	SEPT2	Cerveira <i>et al.</i> (2006)	AML, t-MDS, t-AML
5	t(3;1)(p21;q23)	3p21	NCKIPSD/AF3P21	Sano <i>et al.</i> (2000)	t-AML
6	t(3;1)(p21.3;q23)	3p21.3	DCP1A	This manuscript <sup>b</sup>	ALL
7	t(3;1)(q21.3;q23)	3q21.3	EEFSEC/SELB	Meyer <i>et al.</i> (2005) <sup>p</sup>	ALL
8	t(3;1)(q24;q23)	3q24	GMPS	Pegram <i>et al.</i> (2000)	t-AML
9	t(3;1)(q27~q28;q23)	3q27~q28	LPP	Daheron <i>et al.</i> (2001)	t-AML
10	t(4;1)(p12;q23)	4p12	FRYL	Hayette <i>et al.</i> (2006)	t-ALL, t-AML
11	t(4;1)(q21.1;q23)	4q21.1	SEPT11/FLJ10849	Kojima <i>et al.</i> (2004)	CML
12	t(4;1)(q21;q23)	4q21	AFF1/AF4	Gu <i>et al.</i> (1992)	ALL, t-ALL, (AML)
13	t(4;1)(q35.1;q23)	4q35.1	SORBS2/ARGBP2	Pession <i>et al.</i> (2006)	AML
14	complex abnormalities	5q12.3	CENPK/FKSG14	Taki <i>et al.</i> (1996)	AML
15	ins(5;1)(q31;q13q23)	5q31	AFF4/AF5Q31	Taki <i>et al.</i> (1999)	ALL
16	t(5;1)(q31;q23)	5q31	ARHGAP26/GRAF	Borkhardt <i>et al.</i> (2000)	JMML
17	t(6;1)(q12~13;q23)	6q12~q13	SMAP1	Meyer <i>et al.</i> (2005) <sup>p</sup>	AML
18	t(6;1)(q21;q23)	6q21	FOXO3/AF6Q21	Hillion <i>et al.</i> (1997)	t-AML
19	t(6;1)(q27;q23)	6q27	MLLT4/AF6	Prasad <i>et al.</i> (1993)	AML, t-AML, ALL
20	t(7;1)(p22.1;q23)	7p22.1	TNRC18/KIAA1856	This manuscript <sup>b</sup>	ALL
21	t(9;1)(p22;q23)	9p22	MLLT3/AF9	Nakamura <i>et al.</i> (1993)	AML, t-AML, ALL
22	t(9;1)(q33.1~q33.3;q23);	9q33.1~q33.3	DAB2IP/AF9Q34	von Bergh <i>et al.</i> (2004)	AML
23	ins(11;9)(q23;q34)inv(11)(q13q23)	9q34	FNBP1/FBP17	Fuchs <i>et al.</i> (2001)	AML
24	t(9;1)(q31~q34;q23)	9q31~q34	LAMC3	This manuscript <sup>b</sup>	t-AML
25	t(10;1)(p11.2;q23)	10p11.2	ABI1	Taki <i>et al.</i> (1998)	AML
26	ins(10;11)(p12;q23q13)	10p12	MLLT10/AF10	Chaplin <i>et al.</i> (1995)	AML, t-AML, (ALL)
27	ins(10;11)(p12;q23)	10p12	NEBL	This manuscript <sup>b</sup>	AML
28	t(10;1)(q21;q23)	10q21	TET1/LCX	Ono <i>et al.</i> (2002)	AML
29	inv(11)(p15.3q23)	11p15.3	NRIP3	Balgobind <i>et al.</i> , submitted <sup>a</sup>	AML
30	t(11;1)(q13.4;q23)	11q13.4	ARHGEF17	Teuffel <i>et al.</i> (2005) <sup>p</sup>	AML
31	inv(11)(q13.4q23)	11q13.4	C2CD3/DKFZP586P0123	This manuscript <sup>b</sup>	AML
32	inv(11)(q14q23)	11q14	PICALM/CALM	Wechsler <i>et al.</i> (2003)	AML
33	inv(11)(q21q23)	11q21	MAML2	Meyer <i>et al.</i> (2006) <sup>p</sup>	t-T-ALL, t-AML
34	t(11;15)(q23q;q21)inv(11)(q23q23)	11q23	UBE4A	This manuscript <sup>b</sup>	MDS
35	del(11)(q23q23.3)	11q23.3	ARHGEF12/LARG	Kourlas <i>et al.</i> (2000)	AML
36	del(11)(q23q23.3)	11q23.3	CBL	Fu <i>et al.</i> (2003)	AML
37	del(11)(q23q23.3)	11q23.3	BCL9L	Meyer <i>et al.</i> (2006) <sup>p</sup>	ALL
38	del(11)(q23q24.2)	11q24.2	TIRAP	Meyer <i>et al.</i> (2006) <sup>p</sup>	AML
39	del(11)(q23q24.2)	11q24.2	DCPS	Meyer <i>et al.</i> (2005) <sup>p</sup>	AML
40	t(11;12)(q23;q13.2)	12q13.2	CIP29	Hashii <i>et al.</i> (2004)	AML
41	t(11;14)(q23.3;q23.3)	14q23.3	GPHN	Kuwada <i>et al.</i> (2001)	AML, t-AML
42	t(11;14)(q32.33;q32.33)	14q32.33	KIAA0284	Burmeister <i>et al.</i> (2008) <sup>b</sup>	AML
43	t(11;15)(q23;q14)	15q14	CASC5/AF15Q14	Hayette <i>et al.</i> (2000)	AML, ALL
44	t(11;15)(q23;q14)	15q14	ZFYVE19/MPFYVE	Chinwalla <i>et al.</i> (2003)	AML
45	t(11;16)(q23;p13.3)	16p13.3	CREBBP/CBP	Taki <i>et al.</i> (1997)	t-MDS, t-AML, t-ALL
46	t(11;17)(q23;p13.1)	17p13.1	GAS7	Megonigal <i>et al.</i> (2000)	t-AML
47	ins(11;17)(q23;q21)	17q21	ACACA	Meyer <i>et al.</i> (2005) <sup>p</sup>	AML
48	t(11;17)(q23;q21)	17q21	MLLT6/AF17	Prasad <i>et al.</i> (1994)	AML
49	t(11;17)(q23;q11~q21.3)	17q11~q21.3	LASP1	Strehl <i>et al.</i> (2003)	AML
50	t(11;17)(q23;q25)	17q25	SEPT9/AF17Q25	Osaka <i>et al.</i> (1999)	t-AML, AML
51	t(11;19)(q23;p13.1)	19p13.1	ELL	Thimman <i>et al.</i> (1994)	AML, t-AML
52	t(11;19)(q23;p13)	19p13.3	SH3GL1/EEN	So <i>et al.</i> (1997)	AML
53	ins(11;19)(q23;p13.2)	19p13.2	VAV1	This manuscript <sup>b</sup>	AML
54	t(11;19)(q23;p13.3)	19p13.3	MLLT1/ENL	Tkachuk <i>et al.</i> (1992)	ALL, AML, t-AL
55	t(11;19)(q23;p13.3)	19p13.3	ASAH3/ACER1	Lo Nigro <i>et al.</i> (2002)	ALL
56	t(2;11;19)(p23.3;q23;p13.3)	19p13.3	LOC100128568	This manuscript <sup>b</sup>	AML
57	t(11;19)(q23;p13.3~p13.2)	19p13.3~p13.2	MYO1F	Lo Nigro <i>et al.</i> (2002)	AML
58	t(11;19)(q23;q13)	19q13	ACTN4	This manuscript <sup>b</sup>	ALL
59	t(11;20)(q23;q11)	20q11	MAPRE1	Fu <i>et al.</i> (2005)	ALL
60	t(11;22)(q23;q11.21)	22q11.21	SEPT5/CDCREL	Megonigal <i>et al.</i> (1998)	AML, T-ALL
61	t(11;22)(q23;q13.2)	22q13.2	EP300/P300	Ida <i>et al.</i> (1997)	t-AML
62	t(X;11)(q13.1;q23)	Xq13.1	FOXO4/AFX	Parry <i>et al.</i> (1994)	ALL, AML
63	ins(X;11)(q24;q23)	Xq24	SEPT6	Borkhardt <i>et al.</i> (2001)	AML
64	ins(11;X)(q23;q28q13.1)	Xq28	FLNA	This manuscript <sup>b</sup>	AML

**Tabella 8.** Alcuni partners di fusione di MLL clonati e sequenziati <sup>[73]</sup>.

I geni partner codificano per proteine differenti, con diversa funzione e localizzazione (nucleare, citoplasmatica o di membrana):

- molecole di signalling, di norma localizzate nel citoplasma o nelle giunzioni intercellulari;

- fattori nucleari implicati in vari aspetti della regolazione trascrizionale, ricchi in prolina e serina, con segnali di localizzazione nucleare NLS (**Figura 8**).



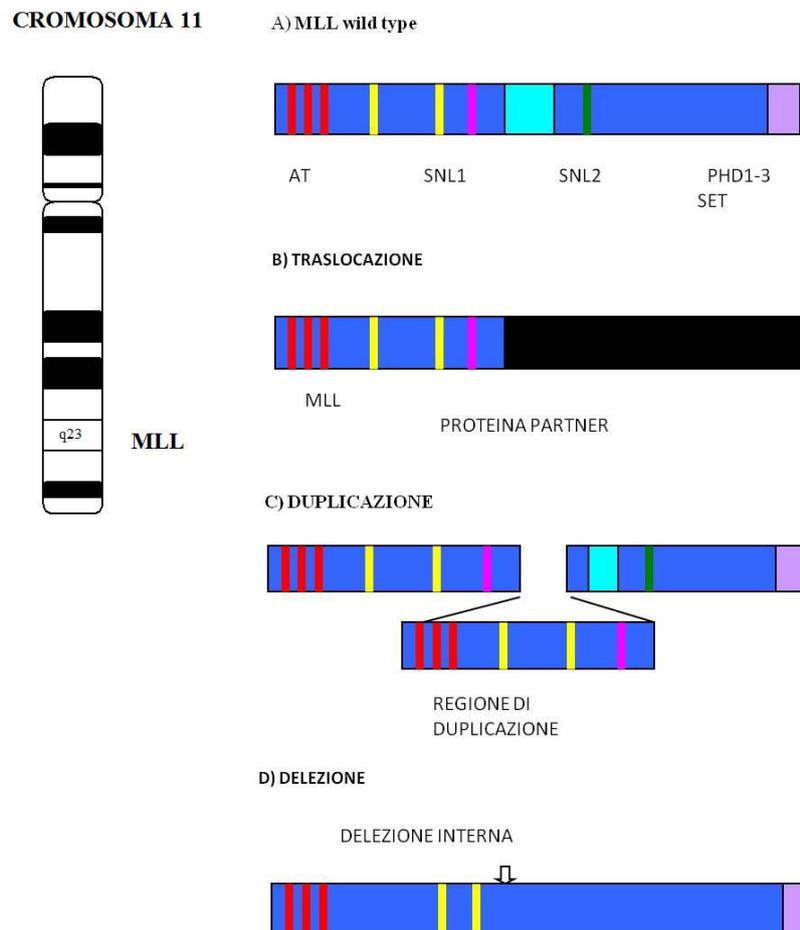
**Figura 8.** Localizzazione delle principali oncoproteine di fusione di MLL <sup>[74]</sup>.

Tuttora si continuano a scoprire nuove traslocazioni cromosomiche del gene MLL <sup>[73,75,76]</sup>. Per esempio, nel Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica è stato recentemente isolato un nuovo gene partner di MLL; si tratta del gene ArgBP2, localizzato sul sito cromosomico 4q35 (**Figura 7 e Tabella 8**) <sup>[77]</sup>. La fusione tra MLL ed ArgBP2 avviene nella traslocazione t(4;11)(q35;q23), individuata in una paziente con meno di 1 anno di età che presentava alla diagnosi una LAM-M5.

Inoltre, i diversi geni partner di MLL influiscono anche sull'espressione genica a valle di MLL, permettendo la definizione di differenti sottogruppi di classi di rischio, prognosi e outcome clinico <sup>[78]</sup>.

Le leucemie con alterazioni 11q23/MLL non comprendono solo traslocazioni nella regione BCR ma anche numerose altre alterazioni:

- PTD (“partial tandem duplication”): le duplicazioni si verificano quando una regione si presenta più di una volta nello stesso cromosoma. Per quanto riguarda il gene MLL, le duplicazioni coinvolgono la porzione N-terminale, e si ripetono in tandem all’interno della regione codificante (**Figura 9C**) o addirittura dell’intero gene MLL <sup>[29]</sup>;
- delezioni: le delezioni comportano la perdita di un segmento del cromosoma, che in MLL è in genere l’esone 8 <sup>[29]</sup> (**Figura 9D**);
- amplificazioni: consistono in una sovrapproduzione della proteina MLL.

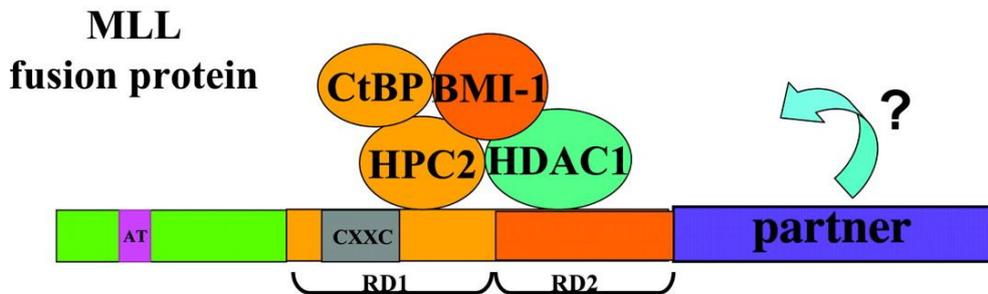
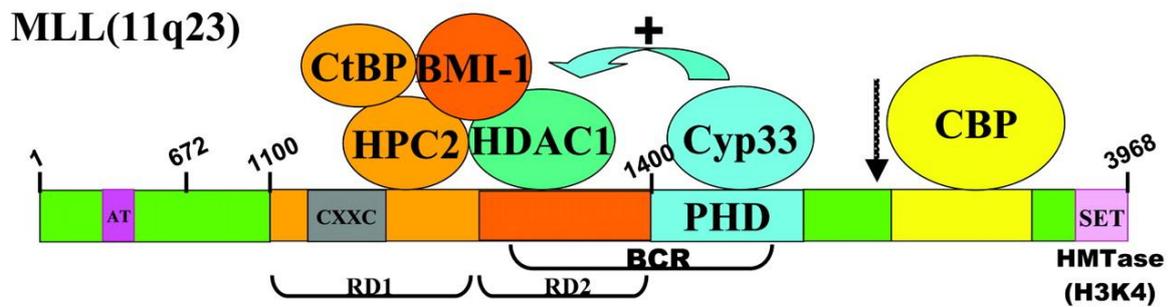


**Figura 9.** Rappresentazione dei riarrangiamenti del gene MLL. (A) MLL *wild type*. (B) Traslocazione. (C) Duplicazione. (D) Delezione.

## 2.5 Traslocazioni 11q23

Le più frequenti traslocazioni di MLL (>85%) <sup>[23]</sup> comprendono un piccolo gruppo di geni, AF4, AF9, ENL, AF10 e ELL, che agiscono in un comune processo biologico a livello trascrizionale, in particolare attivando la RNA polimerasi II (Pol II) attraverso il fattore positivo di elongazione trascrizionale b (positive transcription elongation factor b, P-TEFb) <sup>[79,80]</sup>. Pol II si assembla nelle regioni dei promotori dei geni attivi ; tali promotori sono fermi e associati con DSIF (inactive DRB-sensitivity inducing factor) e NELF (inhibitory negative elongation factor). L'iniziale attivazione di tali complessi porta alla trascrizione di circa 50 nucleotidi; l'allungamento successivo richiede la chinasi P-TEFb (CDK9/CCNT1) e TFIIF (CDK7/CCNH): tali chinasi fosforilano l'estremità C-terminale della subunità maggiore di Pol II sui residui Serina 2 e 5, DSIF e NELF, ed in questo modo li portano a dissociazione e degradazione. AF4, AF9, ENL, AF10 e ELL legano DOT1L e P-TEFb e li attivano, permettendo la fosforilazione di DSIF e NELF da parte di P-TEFb, e il prosieguo della trascrizione (**Figura 10**) <sup>[79,80]</sup>.

Le traslocazioni che coinvolgono fattori citoplasmatici sono più frequenti nei pazienti adulti, e sono principalmente GAS7, AF1p and AF6, che contengono domini di dimerizzazione che permettono la dimerizzazione dell'oncoproteina di fusione; la porzione conservata di MLL contiene domini di localizzazione nucleare che permettono la traslocazione nel nucleo ed il complesso attiva la trascrizione di geni sotto il controllo di MLL <sup>[23]</sup>.



**Figura 10.** Modello del complesso di repressione associato a MLL *wild type* confrontato con quello associato alla proteina di fusione. Il corepressore CtBP, la proteina PcG HPC2, la BMI-1 e quella HDAC1 (o HDAC2) si legano al dominio repressore di MLL. Il legame di HDAC1 è favorito dalla ciclofillina Cyp33. Il coattivatore CBP, che ha attività acetiltrasferasica, può legarsi al dominio attivatore di MLL. Il dominio SET di MLL ha attività intrinseca di istone H3 lisina 4 metiltrasferasi (HMTasi H3K4). Le proteine corepressori e quelle coattivatori possono entrambe legarsi a MLL *wild type*; l'equilibrio del legame può essere influenzato da altri fattori che in ultimo determinano la funzione di MLL come un particolare locus di gene target. Nella proteina di fusione di MLL leucemogena, l'equilibrio del legame può essere alterato, risultando in una aberrante regolazione dei geni target di MLL. Sono indicati la regione di rottura su MLL detta BCR (*breakpoint cluster region*) e il sito di clivaggio proteolitico di MLL. I numeri si riferiscono agli aminoacidi che compongono la proteina codificata da MLL.

### 2.5.1 Traslocazione t(9;11) (p22;q23)

La traslocazione t(9;11)(p22;q23) MLL-AF9 è la più frequente nelle LAM con riarrangiamento 11q23/*MLL*, con una frequenza del 30-40% [73,75,76]. Tra le LAM con traslocazione MLL, la traslocazione MLL-AF9 è associata a prognosi più favorevole [76].

Il gene AF9 (ALL1 Fused gene from chromosome 9) è anche detto MLLT3 (Myeloid/Lymphoid, o Mixed Lineage Leukemia, Translocated to, 3) o LTG9 (Leukemia with Translocation of Gene from chromosome 9) [79,80].

Il gene AF9 mappa sul sito cromosomico 9p22 e ha una lunghezza di oltre 277547 basi, consiste di 11 esoni e codifica per una proteina di 568

aminoacidi con una massa molecolare di 63,67 KDa <sup>[97]</sup>. La proteina AF9 possiede una sequenza di localizzazione nucleare, domini ricchi di serine e domini ricchi di proline che agiscono come attivatori della trascrizione e che si legano con elevate affinità al DNA. La regione di AF9 interessata nella traslocazione comprende gli esoni 4, 5, 8 o 9<sup>[81]</sup>, e l'oncoproteina di fusione risultante ha dimensioni di circa 170 KDa <sup>[97]</sup>.

Topi mutanti che esprimono MLL-AF9 sotto il controllo del promotore naturale di MLL sviluppano tumori, in particolare leucemie acute; inoltre, la maggior parte di tali leucemie hanno un fenotipo mieloide, proprio come negli esseri umani <sup>[82,83]</sup>. Questi studi indicano che la proteina di fusione è coinvolta nel meccanismo che genera la leucemia, per cui la proteina MLL-AF9 è cancerogena, in particolare è leucemogena.

### **2.5.2 Traslocazione t(4;11)(q21;q23)**

La traslocazione t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4 è la più frequente di tutte le traslocazioni a carico di MLL. E' riportata nel 5% di LAL pediatriche, soprattutto in femmine, e si riscontra in più del 66% di pazienti di età inferiore ai 12 mesi (infant) <sup>[73]</sup>. E' inoltre associata a prognosi sfavorevole.

Il gene AF4 o AFF1 o FEL mappa sul cromosoma 4q21, è lungo 134039 basi, contiene 21 esoni e codifica per una proteina di 3910 aminoacidi della famiglia AF4/LAF4/FMR2 (ALF) che funge da attivatore trascrizionale <sup>[84]</sup>. La proteina AF4 contiene domini di localizzazione nucleare e domini che legano GTP, che si conservano nell'oncoproteina di fusione MLL-AF4 <sup>[85]</sup>. La proteina AF4 contiene inoltre regioni ricche di cisteine che vengono ripiegate in sei domini simili a dita di zinco. La proteina AF4 ha dimensioni di circa 140 KDa, mentre l'oncoproteina MLL-AF4 di circa 240 KDa <sup>[85]</sup>. La regione del *breakpoint* si spande per circa 8 kb e comprende diversi esoni <sup>[84-86]</sup>.

Come AF9, ENL e AF10, anche AF4 funge da mediatore della metilazione degli istoni H3-K79 reclutando DOT1 per l'elongazione da parte di Pol II <sup>[86]</sup>.

Anche la proteina codificata dall'oncogene reciproco, AF4-MLL, ha attività a livello trascrizionale: è stato mostrato che AF4-MLL è in grado di indurre leucemia anche in assenza di MLL-AF4 [87]. Si è anche visto che l'attività combinata di MLL-AF4 e AF4-MLL conferisce resistenza all'apoptosi, capacità di procedere nel ciclo cellulare e trasformazione della crescita <sup>[88]</sup>.

### **2.5.3 Traslocazione t(11;19)(q23;p13.3)**

La traslocazione (11;19)(q23;p13.3) MLL-ENL, è stata riscontrata in leucemie di tipo LAM mielomonocitica M4/M5 (4%) e in LAL, comprese T-LAL (10%) <sup>[75,89]</sup>.

Il gene ENL (eleven-nineteen leukemia) o MLLT1, LTG19, YEATS1, si trova sul cromosoma 19p13.3, è lungo 69568 basi, ha 12 esoni, e codifica per una proteina di 559 aminoacidi con capacità di attivazione della trascrizione genica. La proteina ENL ha peso molecolare di circa 75 KDA, mentre l'oncoproteina MLL-ENL di circa 250 KDa <sup>[59]</sup>. La sequenza aminoacidica di tale dominio è altamente conservata tra ENL e AF9 ed è mantenuta in tutte le proteine di fusione MLL-ENL e MLL-AF9 <sup>[90]</sup>. L'attivazione della trascrizione genica consiste soprattutto nell'aumento di acetilazione, metilazione di Lys4, demetilazione di Lys79 dell'istone 3 in modo da rendere la cromatina trascrizionalmente attiva, in particolare a carico dei geni HOXA9, HOXA7, MEIS1 e Pbx3 <sup>[65]</sup>. La proteina di fusione MLL-ENL agisce da potente transattivatore, soprattutto del promotore e quindi della trascrizione di HOXA7 e HOXA9, grazie al contributo della regione metiltrasferasica di MLL in combinazione con la regione C-terminale di ENL

<sup>[36]</sup>. HOXA9 di per sé è debolmente oncogeno, mentre in associazione con MEIS1 abbrevia drammaticamente il periodo di latenza di una leucemia nel 100% dei modelli murini <sup>[36]</sup>. Questo è potenzialmente un meccanismo chiave della trasformazione indotta dalla proteina di fusione di MLL, perché HOXA7 e HOXA9, in combinazione con MEIS1 hanno dimostrato di trasformare cooperativamente progenitori mieloidi per indurre una leucemia aggressiva nei modelli sperimentali, attraverso un blocco reversibile della differenziazione mieloide, a cui consegue l'immortalizzazione cellulare. La proteina di fusione MLL-ENL è in grado di mediare l'immortalizzazione solo di una ristretta popolazione di progenitori emopoietici, in cui la risposta apoptotica in seguito all'espressione della proteina di fusione non è funzionale, a causa della perdita di espressione o di attività di un componente critico, o a causa della precedente acquisizione di una mutazione, che annullino il meccanismo di morte cellulare <sup>[34]</sup>.

#### **2.5.4 Traslocazione t(X;11)(q13.1;q23)**

La traslocazione t(X;11)(q13.1;q23) MLL-AFX o FOXO4 si trova espressa in leucemie acute sia mieloidi sia linfoblastiche <sup>[73]</sup>.

Il gene AFX contiene 3 esoni di cui i primi due sono inframmezzati da un lungo introne in cui si trova il *breakpoint* (nucleotidi 2913/2914) <sup>[91,92]</sup>.

Il gene AFX codifica per un fattore di trascrizione e regolatore della trascrizione di geni coinvolti nell'apoptosi e nel ciclo cellulare <sup>[92,93]</sup>.

La proteina AFX consiste in 3171 aminoacidi, pesa circa 53 kDa ed è ricca in residui di serina, prolina e leucina. L'oncoproteina di fusione MLL-AFX risulta di dimensioni di circa 265 kDa <sup>[93]</sup>.

### 2.5.5 Traslocazione t(6;11)(q27;q23)

La traslocazione t(6;11)(q27;q23) MLL-AF6 si trova in circa il 5-10% delle LAM, sia pediatriche sia adulte <sup>[73,77]</sup>. Le LAM con traslocazione MLL-AF6 risultano essere tra le più aggressive e a prognosi peggiore rispetto alle traslocazioni MLL-AF9 e le altre LAM con traslocazione MLL <sup>[77]</sup>.

Il gene AF6 è espresso in diversi tipi cellulari e codifica per una proteina di 1612 aminoacidi con peso molecolare di circa 182 KDa <sup>[94-97]</sup>. La proteina AF6 contiene brevi sequenze ricche in proline, aminoacidi carichi, serine e glutammine. Inoltre contiene il motivo GLGF che si ritrova in molti vertebrati e invertebrati e si ritiene coinvolto nella trasduzione del segnale a livello delle giunzioni cellulari <sup>[94]</sup>. Rispetto ad AF9, AF4, ENL, e AF10, che sono proteine nucleari, AF6 ha localizzazione citoplasmatica. AF6 è stata identificata come proteina che lega GTP-Ha-Ras, e si pensa che svolga la sua attività nella formazione dei complessi di giunzione della membrana plasmatica e del citoscheletro <sup>[98,99]</sup>. Quando però si forma l'oncoproteina di fusione MLL-AF6, la localizzazione risulta nucleare, probabilmente per i domini di sublocalizzazione nucleare contenuti nella porzione conservata di MLL <sup>[97]</sup>. L'oncoproteina di fusione risulta di circa 325 KDa <sup>[97]</sup>.

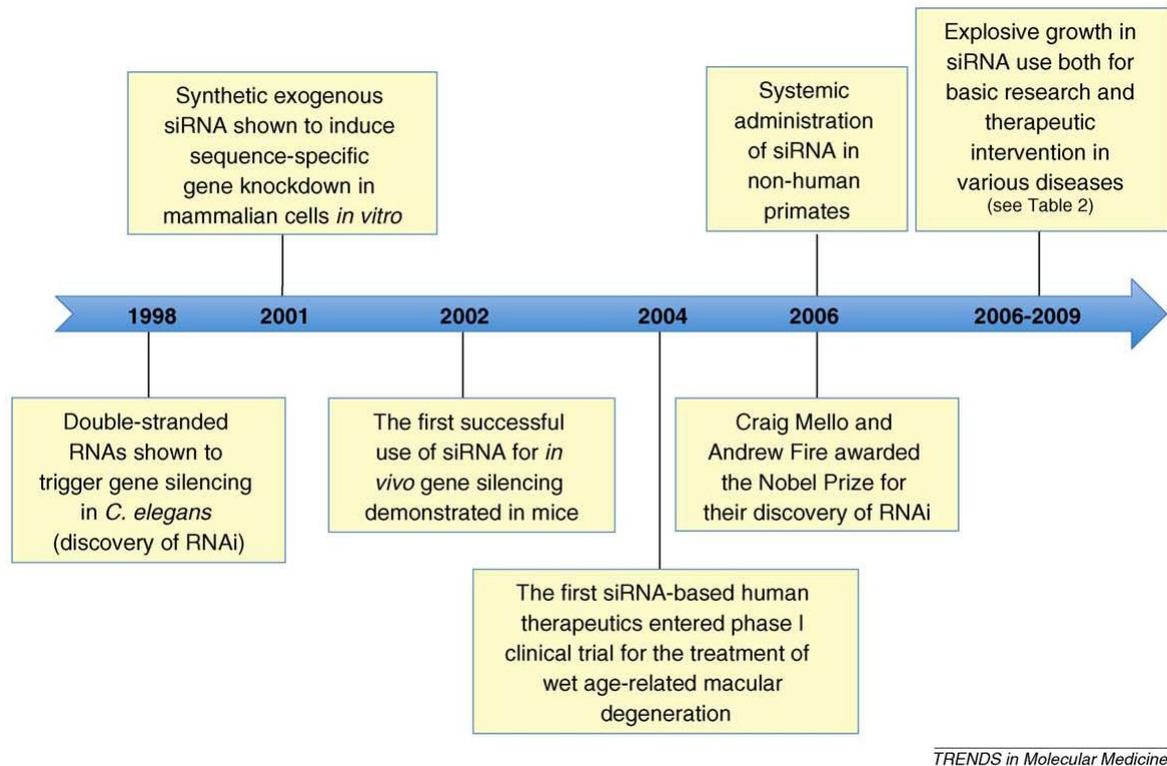
### 3. *Small Interfering RNA (siRNA)*

#### 3.1 Introduzione

Il meccanismo dell'interferenza dell'RNA (RNA interference, RNAi) è un processo biologico conservato durante l'evoluzione che regola l'espressione genica <sup>[100-103]</sup>. Il processo è mediato da piccoli RNA a doppio filamento (*small interfering RNA*, siRNA), che guidano la degradazione dell'mRNA bersaglio che presenta sequenza complementare al filamento antisenso del siRNA <sup>[104,105]</sup>. Si pensa che il meccanismo dell'interferenza sia una difesa naturale conservata nell'evoluzione per distruggere il DNA o l'RNA esogeno che deriva da agenti infettivi quali virus e batteri. Le cellule di mammifero, infatti, reagiscono alla presenza di lunghi filamenti di DNA o RNA a doppio filamento con meccanismi di difesa aspecifici, come la risposta dell'interferon, o specifici, come l'interferenza genica.

La scoperta del silenziamento genico da parte di RNA a doppio filamento è dovuta agli studiosi Andrew Fire e Craig Mello, che vinsero anche il Premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina nel 2006 per la scoperta del silenziamento genico (**Figura 11**) <sup>[106,107]</sup>. Fire e Mello scoprirono che un piccolo RNA a doppio filamento di circa 19-21 paia di basi (da qui *small interfering RNA*, siRNA) iniettato in cellule bersaglio può bloccare la trascrizione genica di un gene con sequenza complementare al filamento senso del siRNA. Fire e Mello costruirono un RNA a doppio filamento con sequenza complementare al gene codificante una proteina contrattile del nematode *C. Elegans*, e videro che, a seguito dell'iniezione dell'RNA, il nematode subiva contrazioni a scatti invece che muoversi fluidamente. Spiegarono quindi l'inibizione dell'espressione genica al meccanismo dell'RNA a doppio filamento. Una conferma è data anche dal fatto che Fire e

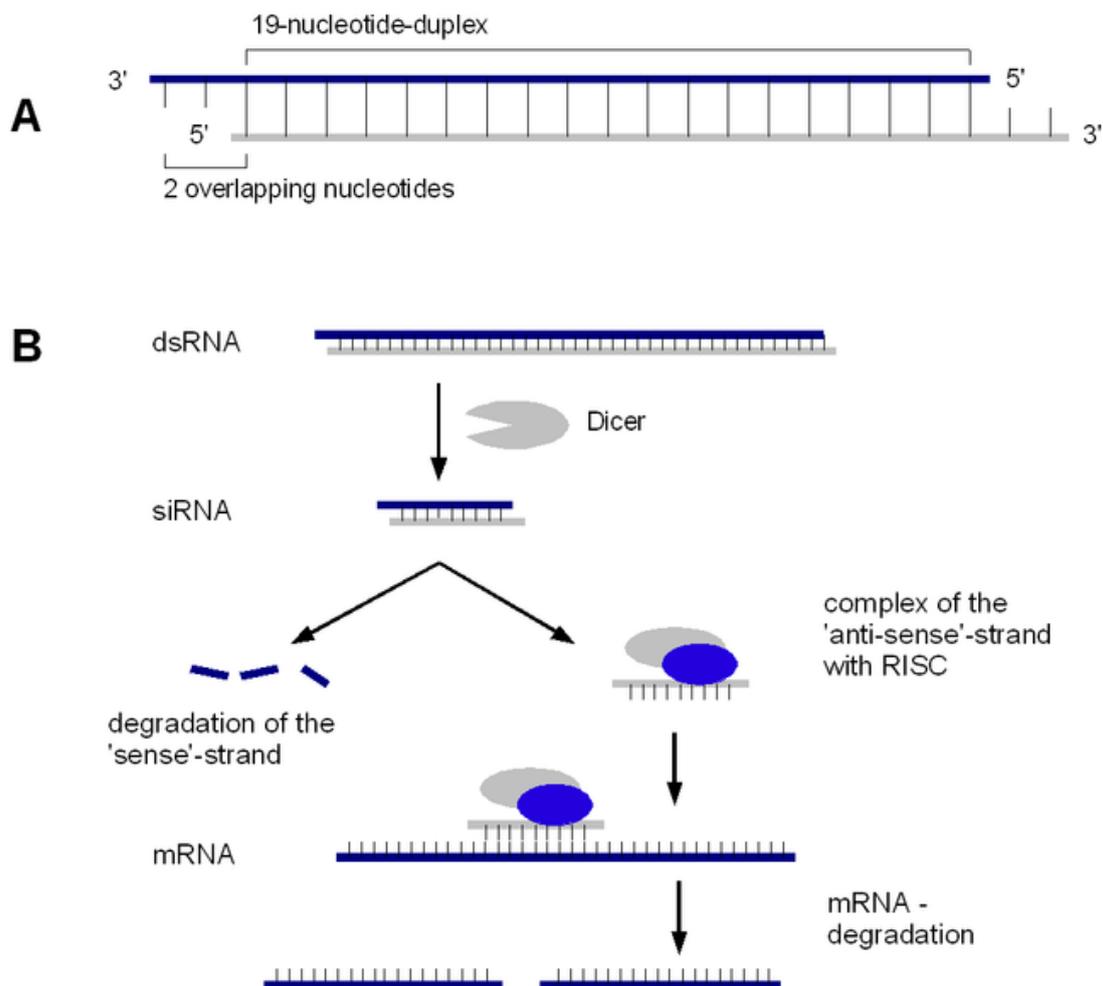
Mello provarono anche a iniettare solo i singoli filamenti, e non ebbero risultati come iniettando il doppio filamento.



**Figura 11.** Cenni storici sulle scoperte relative ai siRNA <sup>[108]</sup>.

Il primo studio pionieristico sui siRNA è dovuto agli studi biochimici di Zamore *et al.* <sup>[109]</sup> ed Elbashir *et al.* <sup>[110,111]</sup> su *Drosophila melanogaster*, in cui si constatò l'attività di silenziamento di siRNA *in vitro* in culture cellulari umane <sup>[102]</sup>. Il meccanismo dell'interferenza (**Figura 12**) <sup>[112-117]</sup> inizia con un processo ATP-dipendente in cui una RNasi III, Dicer, processa lunghi filamenti di RNA a doppio filamento in piccoli filamenti di RNA a doppio filamento (*small interfering* RNA, siRNA) di 19-25 paia di basi, in cui 19 basi sono complementari tra i due filamenti, mentre 2 basi in posizione 3' di ogni filamento sono protrudenti (overhang). Il secondo passaggio consiste nell'incorporazione del siRNA in un complesso ribonucleoproteico (RISC: RNA induced silencing complex), in cui i due filamenti del siRNA vengono separati e seguono percorsi diversi: il filamento antisenso (o guida) rimane all'interno del complesso RISC per mediare l'attività di interferenza, mentre il

filemento senso (passeggero) viene degradato. Il filamento antisenso si appaia per complementarità all'mRNA bersaglio e le proteine con attività endonucleasica del complesso RISC Argonaute (Ago2, PIWI) e Slicer tagliano l'mRNA bersaglio a livello dei nucleotidi 10-11 (a partire all'estremità 5' del filamento antisenso). L'elevata specificità del processo è dovuta all'appaiamento per complementarità delle basi del siRNA con l'mRNA bersaglio. Infatti, una singola modificazione alle basi suddette blocca il taglio da parte di RISC.



**Figura 12.** Schema del meccanismo d'azione dei siRNA.

Il meccanismo dell'interferenza può essere attivato tramite l'introduzione di siRNA sintetici o vettori codificanti short hairpin RNA

(shRNA) che attivano il meccanismo a diversi livelli: siRNA a livello di RISC, shRNA a livello di Dicer.

In base al fenomeno dell'interferenza, virtualmente ogni gene del genoma umano può essere un possibile bersaglio, basta conoscerne la sequenza per generare un siRNA complementare. I primi studi *in vitro* basati sull'RNA interference sono serviti inizialmente a conoscere l'attività e la funzione di geni e pathway <sup>[103,117,118]</sup>. Infatti, downregolando un particolare gene, si è riusciti a capire la sua funzione cellulare in base alla risposta fenotipica. In seguito agli studi di genomica funzionale, si è passati a studi di downregolazione di geni coinvolti in patologie e nei tumori quali oncogeni, geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, dell'apoptosi, del differenziamento, della risposta ai farmaci <sup>[118-121]</sup>. Attualmente, l'attenzione è rivolta soprattutto a tali bersagli, con lo scopo di ripristinare la condizione fisiologia e curare così la patologia. Inoltre, anche virus e batteri possono essere bersagli di siRNA specifici per il genoma batterico o virale <sup>[118,119]</sup>. La riduzione dell'espressione di proteine patologiche attraverso l'interferenza è applicabile a tutte le classi di bersagli molecolari, inclusi quelli che sono difficilmente raggiungibili con i tradizionali approcci farmacologici a base di piccole molecole o proteine <sup>[118]</sup>. Il potenziale terapeutico per il trattamento di diverse patologie è molto promettente. Questo è particolarmente vero per patologie dovute all'espressione di geni mutanti, proteine dominanti negative, isoforme aberranti di splicing alternativo, sovraespressione di geni con gain-of-function.

I siRNA fanno parte della grande classe dei non coding RNA (ncRNA), che comprendono anche micro RNA (miRNA), trascritti antigene e altre unità trascrizionali <sup>[101]</sup>. Per più di 50 anni si è pensato che l'RNA che non andava a fare parte di mRNA, tRNA o rRNA rimanesse inutilizzato, mentre

recentemente si è vista la partecipazione di questi ncRNA in fenomeni di regolazione genica a livello trascrizionale e post trascrizionale <sup>[122-124]</sup>.

In particolare, i miRNA svolgono un ruolo nel silenziamento genico simile a quello dei siRNA: sono generati a partire da RNA a forcina con regione a doppio filamento maggiore di 16 paia di basi, e forcina a singolo filamento di 6-12 basi <sup>[124,125]</sup>. Tali strutture a forcina si trovano in cluster e vengono chiamati miRNA primari; essi vengono riconosciuti dall'enzima endonucleasi DROSHA RNase-II-like e tagliati in forcine singole chiamate miRNA precursori. A loro volta i precursori vengono trasportati nel citoplasma da un complesso exportin-5/ran-GTP e vengono processati dal complesso DICER a miRNA maturi, di circa 19-21 paia di basi a doppio filamento. La differenza con i siRNA è che l'appaiamento con il bersaglio non è perfettamente complementare ma possiede delle basi non complementari in posizioni precise. La degradazione dell'mRNA bersaglio avviene per opera del complesso RISC.

In base a questi trascritti naturali, sono state sviluppate ulteriori molecole con attività di interferenza e silenziamento genico <sup>[105,112,126]</sup>.

- ASO (antisense oligonucleotide), ODN (oligodeossinucleotidi): oligonucleotidi sintetici a singolo filamento che legano il DNA per complementarietà tramite legami a idrogeno e bloccano la trascrizione o la traduzione.
- TFO (triplex forming oligonucleotide): sequenze oligonucleotidiche che legano il DNA in maniera sito-specifica con legami a idrogeno e inducono downregolazione dell'espressione genica.
- Aptameri: oligonucleotidi di RNA o DNA a singolo o doppio filamento che legano molecole bersaglio in maniera simile al legame di un anticorpo ad un antigene.

- Decoy ODN: sequenze oligonucleotidiche simili alla regione promotori del gene bersaglio che legano fattori di trascrizione e ne impediscono il legame al promotore stesso.
- Ribozimi: RNA catalitici che legano e tagliano l'mRNA bersaglio, inibendo la sintesi proteica.
- DNAzimi: analoghi ai Ribozimi, in cui lo scheletro di RNA è sostituito da DNA, con il vantaggio di una sintesi più semplice e di maggiore stabilità chimica e biologica.

## 3.2 Applicazioni *in vivo*

Tra i maggiori punti critici per l'applicazione in clinica dei siRNA ci sono la presenza di off-target effects (OTE), la *delivery* intracellulare nel sito bersaglio e l'attivazione della risposta immune <sup>[117,127-129]</sup>.

### 3.2.1 Off-target effects

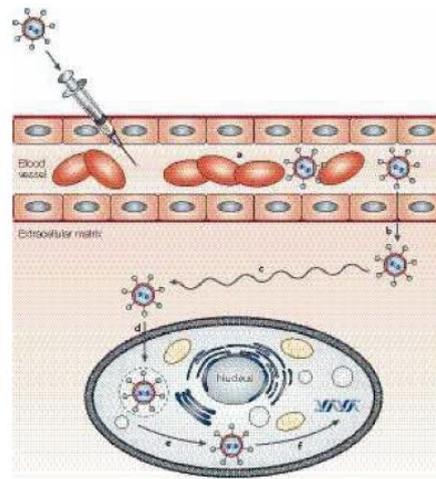
I siRNA possono dare effetti aspecifici (off-target effects, OTE) nel caso in cui si appaiano anche solo parzialmente a sequenze omologhe a quella dell'mRNA bersaglio. Poiché infatti anche appaiamenti di solo 7 basi contigue complementari sono sufficienti a indurre silenziamento, è plausibile che anche i siRNA derivati da un disegno più che attento possano mostrare OTE una volta introdotti nelle cellule <sup>[118,130]</sup>.

Inoltre, i siRNA possono non solo degradare l'mRNA bersaglio, ma anche influenzare la trascrizione inducendo la formazione di cromatina e la metilazione del DNA <sup>[131,132]</sup>.

Per ovviare ai problemi di OTE, è possibile, oltre all'accurato disegno dei siRNA, utilizzare siRNA per lo stesso bersaglio ma con sequenze differenti, ed utilizzare controlli di siRNA che non hanno alcuna sequenza complementare nel genoma (non-targeting, NT, o scramble, SCR) <sup>[118]</sup>.

### 3.2.2 Delivery

A causa dell'elevato peso molecolare (~13 kD) e della carica negativa data dai gruppi fosfato (~42 cariche negative), i siRNA non attraversano facilmente le membrane cellulari e quindi sono necessari sistemi di *delivery* che facilitino l'ingresso nelle cellule [108,114,127,128,133-135]. Inoltre, la somministrazione a livello del sistema circolatorio mette i siRNA nella condizione di dover attraversare diverse barriere biologiche prima di arrivare al bersaglio: degradazione da parte di nucleasi sieriche e tissutali, rapida escrezione da parte del sistema di filtrazione glomerulare renale, fagocitosi e quindi degradazione da parte dei macrofagi circolanti del sistema reticoloendoteliale, difficoltà ad attraversare i capillari endoteliali, lenta diffusione e intrappolamento attraverso la matrice extracellulare (**Figura 13**) [136-138].



**Figura 13.** Barriere fisiologiche alla *delivery* sistemica di siRNA e siRNA complessati a nanoparticelle: filtrazione renale, fagocitosi e degradazione nel torrente circolatorio, trasporto all'interno del sistema vascolare, diffusione attraverso la matrice extracellulare, ingresso intracellulare, rilascio dagli endosomi, attivazione del processo di silenziamento [138].

L'*uptake* cellulare di siRNA avviene soprattutto per endocitosi, ed il problema conseguente principale è l'intrappolamento in endosomi e lisosomi ed il rischio di degradazione da parte degli enzimi lisosomiali (**Figura 14**) [127]. I sistemi di *delivery* devono aumentare l'accumulo di molecole

all'interno della cellula e facilitare il rilascio dagli endosomi nel citoplasma [138]. Diversi sistemi di *delivery* vengono utilizzati, vettori virali o non-virali, con diverse caratteristiche e vantaggi.

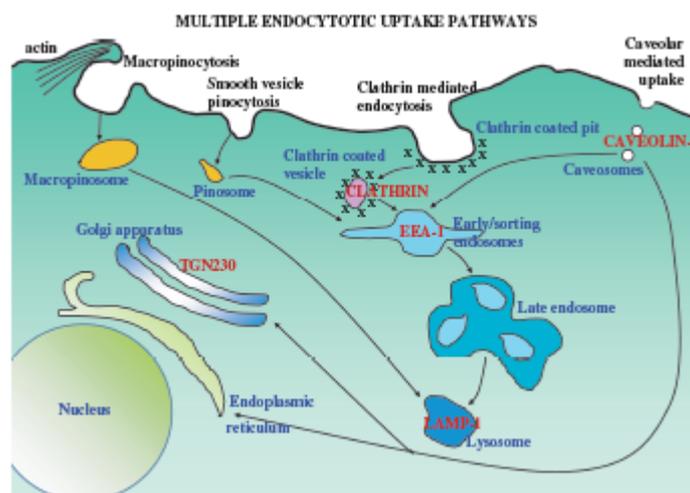


Figura 14. Pathway di endocitosi coinvolti nell'uptake cellulare di siRNA [136].

L'uso di vettori virali per il silenziamento genico viene usato con successo in quanto i virus hanno una naturale capacità ad infettare cellule bersaglio ed a trasferire materiale genetico. I principali vettori virali sono indicati in **Tabella 9** con i rispettivi vantaggi e svantaggi [133,139]. I vettori virali sono comunque ancora in via di studio per l'applicazione *in vivo* a causa dei dubbi sulla sicurezza nell'uomo.

Vettori virali	Vantaggi	Svantaggi
<b>Retrovirus</b>	Elevata efficienza; trasferimento genico stabile; trasmissione alle cellule figlie.	Integrazione nel genoma; mutagenesi inserzionale; attivi solo in cellule proliferanti; non attivi in linee primarie.
<b>Lentivirus</b>	Attivi verso cellule non proliferanti; capacità di trasportare geni di grandi dimensioni.	Applicazione solo topica.
<b>Adenovirus</b>	No rischio di mutagenesi inserzionale; trasferimento genico transiente; utilizzato per applicazioni nel fegato.	Assenza di tropismo tissutale; Effetto transiente; epatotossicità dose-limitante.
<b>Virus adenoassociati</b>	Non patogeni.	Attivi in cellule non proliferanti.
<b>Baculovirus</b>	Probabilmente sicuri.	Conoscenze limitate.

Tabella 9. Vettori virali per la *delivery* di siRNA [133,139].

I sistemi non-virali coinvolgono principalmente molecole come liposomi, polimeri, peptidi, modificazioni chimiche o metodi fisici (**Tabella 10**) (**Figura 15**) <sup>[104,114,133,140,141]</sup>.

<b>Vettori non virali <i>in vitro</i></b>	
<b>Metodi fisici</b>	Gene gun
	Elettroporazione
	Calcio fosfato
	Ultrasuoni
	Microiniezione
<b>Modificazioni chimiche</b>	Phosphorothioate (scheletro)
	Boranophosphonate (scheletro)
	Phosphoroamidate (scheletro)
	Methylphosphonate (scheletro)
	2'-alkyl (zucchero)
	2'-O-Methyl (zucchero)
	2'-O-Methoxyethyl (zucchero)
	2'-Deoxyfluoridine (zucchero)
	PNA
	LNA
	ENA
	Morpholino
	4'-Thio-RNA
	FANA
	Colesterolo
<b>Liposomi</b>	Cationici, anionici, anfotropici
<b>Nanoparticelle e polimeri</b>	Polimeri cationici
	PEI
	Chitosano
	Ciclodestrina
	Collagene
	SNALP
	Aptameri
	Dendrimeri
<b>Cell penetrating peptides (CPP)</b>	Drosophila antennapedia
	HIV Tat
	Influenza H2A fumogeni peptide
	Penetratin transportane
	MPG

**Tabella 10.** Vettori non virali per la *delivery* di siRNA <sup>[104,114,133,140,141]</sup>.

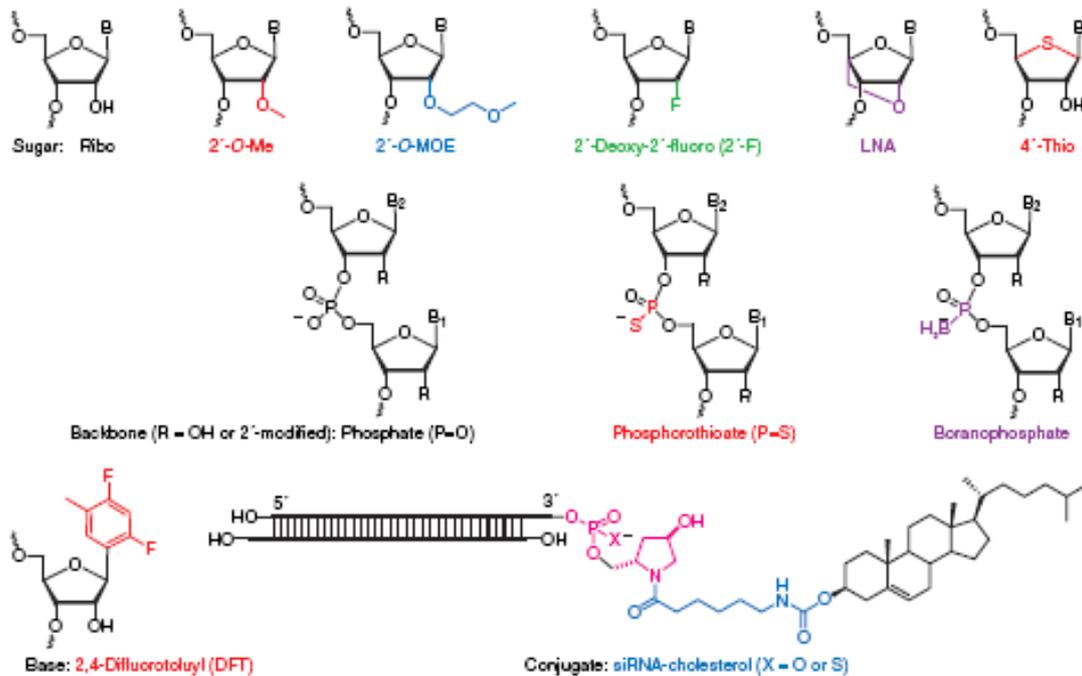
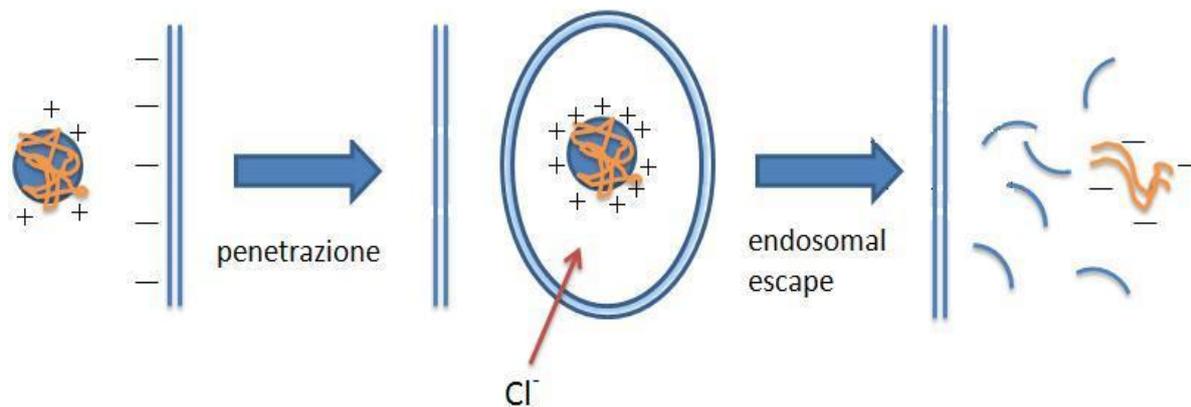


Figura 15. Modificazioni chimiche ai siRNA <sup>[114]</sup>.

Le molecole polimeriche hanno come vantaggio una carica netta positiva che facilita la formazione di complessi con le cariche negative dei siRNA, riducono la carica negativa e aumentano le interazioni con la carica negativa della superficie della membrana cellulare <sup>[142]</sup>. Il complesso viene endocitato, l'alta densità di cariche positive richiama ioni cloruro all'interno dell'endosoma e ciò causa un aumento del pH e un innalzamento della pressione osmotica interna, con successivo rigonfiamento e rottura della membrana. Il siRNA riesce così a fuoriuscire dall'endosoma ed evitare la degradazione e viene rilasciato nel citoplasma. Questo fenomeno è chiamato “*proton-sponge effect*” (Figura 16) <sup>[143]</sup>.



**Figura 16.** Meccanismo di rilascio dei siRNA dagli endosomi tramite il fenomeno “proton sponge effect”<sup>[143]</sup>.

Per quanto riguarda l’introduzione dei siRNA in clinica, è necessario lo sviluppo di sistemi più sofisticati e l’identificazione di metodi di applicazione ottimali<sup>[119]</sup>. Inoltre, i sistemi di *delivery in vivo* devono cercare di aumentare l’emivita e l’up-take cellulare, evitare la risposta immune, ridurre la tossicità o la rapida eliminazione da parte di fegato e reni.

Il primo problema per i siRNA iniettati nel torrente circolatorio è l’emivita, che è molto breve, di circa 6 minuti<sup>[129,134]</sup>. Questo è dovuto soprattutto dalla presenza di nucleasi sieriche che degradano i siRNA, anche se i siRNA sono già più resistenti degli oligonucleotidi a singolo filamento o di altri intermedi alle nucleasi<sup>[128,129]</sup>. Inoltre, sono presenti fagociti che fungono da barriera immunologica, non solo nel sangue, ma anche nella matrice extra-cellulare, rimuovendo materiale che non reputano *self*, perché potenzialmente dannoso per il nostro organismo. L’endotelio dei vasi sanguigni presenta fenestrature molto piccole, generalmente attorno ai 5 nm, però in alcune zone del corpo, e anche nei tumori solidi, queste possono raggiungere una grandezza pari a 200 nm permettendo il passaggio di macromolecole e di complessi<sup>[138]</sup>. Un’altra barriera è costituita dalla matrice extra cellulare e dalla sua composizione (soprattutto polisaccaridi e proteine fibrose), che creano una sorta di resistenza meccanica nei confronti di molecole e complessi di grandi dimensioni. Alcune formulazioni hanno la capacità di accumularsi a livello dei tumori solidi, in base all’ effetto EPR

(*enhanced permeability and retention*), in quanto i tumori solidi hanno un'estesa vascolarizzazione con fenestrate molto più ampie rispetto agli altri vasi del nostro corpo (100-200 nm di diametro) <sup>[138]</sup>. Ciò fa sì che, in questo distretto, le nanoparticelle riescano ad uscire dal circolo, creando un gradiente di concentrazione che le “attira” nella zona del tumore, con conseguente accumulo delle stesse nella matrice extra-cellulare <sup>[138]</sup>.

La biodistribuzione dei siRNA può essere significativamente influenzata dai sistemi di *delivery*. La somministrazione sistemica di nanoparticelle, spesso porta all'accumulo delle stesse all'interno del reticolo endoteliale di organi come fegato, milza, reni e polmoni. Non esistono però, ad oggi, evidenze che questo porti a rischi per la funzionalità di questi organi.

Per sostanze con taglia inferiore ai 50 kDa si ha escrezione attraverso i reni <sup>[136,137]</sup>. Infatti, per quanto riguarda i siRNA liberi, essa avviene molto velocemente in seguito ad una somministrazione sistemica. A prova di ciò, studi sui topi, nei quali si è monitorata la biodistribuzione del siRNA, hanno dimostrato il suo accumulo nelle urine dopo neanche 5 minuti dalla iniezione <sup>[129,134]</sup>. Se invece si complessano i siRNA con altri materiali, creando dei complessi nanoparticellari, le dimensioni del complesso potranno crescere sfuggendo così all'ultrafiltrazione glomerulare.

Inizialmente si è pensato a introdurre siRNA naked <sup>[144,145]</sup>, ma ulteriori studi hanno evidenziato la necessità di modificazioni chimiche per aumentare la stabilità in siero e la specificità alla cellula o organo bersaglio <sup>[104]</sup>. Le modificazioni possono essere a carico dello scheletro nucleotidico, delle basi o degli zuccheri dei siRNA. Con modificazioni chimiche l'emivita di siRNA *in vivo* può allungarsi da minuti a ore, e con l'aggiunta di sistemi di *delivery* può perdurare anche giorni (**Tabella 11**) <sup>[114,127-129,133,140,141,146-150]</sup>.

Delivery in vivo	Caratteristiche	vantaggi	Svantaggi
<b>Naked siRNA</b>	Iniezione di siRNA senza alcun <i>carrier</i>	Semplice	Richiede elevate quantità di siRNA (costoso)
<b>Gene gun</b>	Microproiettili d'oro o tungsteno (1-5 µm) su cui viene adsorbito il DNA, posti all'interno di "cartucce" (tubicini di teflon), sparati mediante un'onda supersonica di elio.	Ideale per pelle, mucose, tessuti esposti durante interventi chirurgici; semplice, efficace, buona efficienza di trasfezione, sufficienti piccolissime quantità di DNA.	Danno tissutale.
<b>Elettroporazione</b>	Applicazione di impulsi elettrici che causano l'apertura di pori temporanei sulle membrane cellulari e permettono l'ingresso dell'acido nucleico.	Ideale per pelle e muscolo; espressione a lungo termine; elevata efficienza di trasfezione.	Range effettivo limitato; chirurgia necessaria per tessuti in profondità; danno da voltaggio
<b>Ultrasuoni</b>	Applicazione di ultrasuoni che causano l'apertura di pori temporanei sulle membrane cellulari e permettono l'ingresso dell'acido nucleico.	Ideale per <i>delivery</i> a organi interni e <i>delivery</i> sito-specifica.	Bassa efficienza di <i>delivery in vivo</i>
<b>Hydrodynamic injection (High pressure injection)</b>	Iniezione dell'acido nucleico in soluzione fisiologica di volume 10% del peso corporeo in 5-7 secondi nella vena caudale (per il topo).	Poco costoso; elevata efficienza di trasfezione; ideale per <i>delivery</i> fegato; applicabile a qualunque tipo di composto o particella.	Applicabile solo in modelli animali; applicabile solo al fegato come bersaglio.
<b>Modificazioni chimiche</b>		Aumentano la stabilità in siero.	Richiedono un <i>carrier</i> ; costose.
<b>Liposomi cationici, lipoplessi</b>	Doppio strato di fosfolipidi che si richiude a formare una sfera con core acquoso, carica positivamente. Racchiude l'acido nucleico all'interno del core, entra nella cellula per endocitosi e rilascia l'acido nucleico.	Si distribuiscono in numerosi organi; hanno buona efficienza di trasfezione; l'acido nucleico è protetto dalle nucleasi; facilitano il rilascio intracellulare evitando la distruzione da parte dei lisosomi; facili da preparare.	Non hanno specificità di cellula o tessuto; la carica elettrica diminuisce l'efficienza di <i>delivery</i> ; la carica elettrica interagisce con componenti del sangue; vengono intrappolati o embolizzati nel microcircolo, attivando la risposta
<b>PEG</b>	Polimero a base di ossido di etilene	Non tossico, inerte, non immunogeno, non viene assorbito dal tratto gastrointestinale. Quando viene complessato con proteine permette il rallentamento della clearance renale, quindi una maggiore emivita ematica e stabilità del farmaco, una minore tossicità e una riduzione della frequenza di dosaggio. E' flessibile, solubile in acqua. Rende idrosolubili molecole idrofobiche. Crea pressione	

Tabella 11. Sistemi di *delivery in vivo* [114,127-129,133,140,141,146-150]

Delivery in vivo	Caratteristiche	vantaggi	Svantaggi
<b>PEI</b>	<p>Poliamina alifatica, può trovarsi in formaleone o ramificata. E' la molecola organica con il più alto potenziale di densità di cariche cationiche, quindi possiede una sostanziale capacità tamponante virtualmente ad ogni pH. Instaura interazioni non covalenti con molecole cariche negativamente quali gli acidi nucleici. PEI viene internalizzato per endocitosi e tampona il pH acido degli endosomi. In questo modo funge da "spugna protonica", aumentando il flusso di protoni e acqua, facendo esplodere gli endosomi e rilasciando il contenuto nel citoplasma.</p>	<p>Ideale per <i>delivery</i> al polmone; sia per siRNA che DNA; <i>delivery</i> sistemica; facilita il rilascio intracellulare evitando la distruzione da parte dei lisosomi (proton-sponge effect).</p>	<p>Costoso; difficile da preparare; non biodegradabile; tossicità e attività di trasfezione dipendente dal peso molecolare</p>
<b>Atelocollagene</b>	<p>Polimero derivato dal collagene, forma nanoparticelle interagendo con molecole cariche negativamente quali gli acidi nucleici.</p>	<p>Naturale; resistente alle nucleasi, non immunogenico, non tossico, biocompatibile, biodegradabile</p>	<p>Non ha specificità di tessuto o organo</p>
<b>Ciclodestrina</b>	<p>Polimero a base di ciclodestrina, forma nanoparticelle interagendo con molecole cariche negativamente quali gli acidi nucleici.</p>	<p>Non tossico, non immunogenico</p>	
<b>Chitosano</b>	<p>Polimero a base di chitosano; polisaccaride naturale carico positivamente, con proprietà mucoadesive. Forma nanoparticelle interagendo con molecole cariche negativamente quali gli acidi nucleici.</p>	<p>Non tossico, biocompatibile, biodegradabile, buona efficienza di trasfezione</p>	
<b>CPP (cell penetrating peptide)</b>	<p>Peptidi che contengono un elevato numero di AA basici e che possono trasportare macromolecole anche polari, oligonucleotidi e proteine attraverso le membrane cellulari. Possiedono brevi sequenze di aminoacidi carichi positivamente che facilitano il passaggio attraverso le membrane con un meccanismo recettore-indipendente. Contengono soprattutto aminoacidi anfipatici carichi positivamente che interagiscono con le teste polari cariche negativamente delle membrane cellulari.</p>	<p>Selettività di tessuto</p>	<p>Costosi</p>

Tabella 11. Sistemi di *delivery in vivo* <sup>[114,127-129,133,140,141,146-150]</sup> (continua).

### 3.2.3 Risposta immune innata

Da considerare per le applicazioni *in vivo* è la risposta immunitaria innata e l'attivazione del sistema degli interferoni (INF) <sup>[110,111,117,151-153]</sup>. Il sistema degli interferoni viene indotto da molecole di RNA a doppio filamento, derivate per esempio da infezione virale, e rappresenta il primo meccanismo di difesa naturale dell'organismo verso le infezioni virali <sup>[154,155]</sup>. Il riconoscimento di lunghe molecole di RNA a doppio filamento può avvenire ad opera di serine-treonine chinasi PKR <sup>[156,157]</sup> o del Toll-like receptor 3 (TLR3) <sup>[158,159]</sup> e porta alla produzione di interferoni di tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), specialmente nelle cellule dendritiche plasmacitoidi (PDC, chiamate anche cellule produttrici di INF, IPC). Di conseguenza viene aumentata l'espressione di geni dipendenti dall'interferone, e/o inibita la sintesi di proteine e di meccanismi dell'apoptosi. Questo meccanismo è verificato verso lunghe molecole di RNA a doppio filamento, mentre i piccoli siRNA sintetici dovrebbero aggirare il problema, essendo troppo piccoli per attivare il sistema dell'interferone <sup>[109-111,160]</sup>, anche se diversi studi dimostrano l'induzione del sistema degli interferoni e significativi cambiamenti aspecifici dell'espressione genica a seguito di introduzione di siRNA <sup>[117,153]</sup>.

Il sistema immune innato viene stimolato soprattutto da sequenze ricche in GU, per esempio 5'-UGUGU-3', che si riscontrano in particolare nella regione 3'UTR <sup>[152,161-163]</sup>.

Quindi per l'applicazione di siRNA *in vivo* in sistemi mammiferi, la risposta dell'interferone è da evitare o almeno da ridurre attraverso un disegno razionale di siRNA in modo che non contengano sequenze immunostimolatorie, utilizzando la minor dose efficace possibile di siRNA, ottimizzando i sistemi di *delivery* per ridurre la risposta immune, e definendo livelli minimi accettabili di risposta dell'interferone.

### 3.2.4 Studi preclinici

Molti studi preclinici hanno come scopo il trattamento del cancro, in particolare l'inibizione della crescita tumorale <sup>[119,164-166]</sup>. Le molecole bersaglio sono di solito geni coinvolti nella crescita tumorale, come fattori di crescita, recettori, molecole antiapoptotiche, molecole di trasduzione del segnale. Gli studi preclinici consistono in inoculi sottocutanei o ortotopici di diversi tipi tumorali in modelli murini, e somministrazione di siRNA per via locale o sistemica, con formulazioni diverse tra quelle suddette. Alcuni studi hanno come scopo l'inibizione dell'angiogenesi per cercare di bloccare l'evoluzione del tumore in metastasi, per esempio a fegato, polmoni o ossa, in quanto molti pazienti hanno gravi problemi di metastatizzazione del tumore primario <sup>[167,173]</sup>.

Altri studi si occupano di siRNA come trattamento antivirale, avendo come obiettivo il silenziamento di geni virus-specifici <sup>[119]</sup>. I modelli animali vengono infettati con il virus, e lo scopo del trattamento con siRNA è inizialmente la riduzione del titolo virale e poi gli effetti protettivi e di aumento di sopravvivenza dell'ospite.

Altri bersagli riguardano qualunque tipo di patologia associata a disregolazione di particolari geni, come patologie cardiache, epatiche, renali, polmonari, neuronali, oculari, ... <sup>[119]</sup>.

Sono attualmente in fase di sperimentazione clinica i farmaci a base di oligonucleotidi o siRNA descritti in **Tabella 12** <sup>[119,127,128,138,141,164]</sup>.

Nome	Bersaglio	Fase	Ditta
<b>PFT1</b>	AKIi-5 for acute kidney injury	Preclinical	SR Pharma plc
<b>Sirna-034</b>	hepatitis C	Preclinical	Sirna Therapeutics
<b>RTP-801i (Atugen AG)</b>	AMD	I	SR Pharma plc
<b>ALN-RSV01</b>	RSV lung infection	I	Alnylam
<b>Sirna-027 (AGN211745)</b>	VEGFR1 in AMD (age-related macular degeneration)	I	Sirna Therapeutics
<b>Cand5</b>	VEGFR1 in AMD (age-related macular degeneration)	I	Acuity
<b>AVI-4557</b>	Cytocrome P450, Drug metabolism	I	AVI
<b>AVI-4065</b>	HCV (hepatitis)	I	AVI
<b>GRN163L</b>	Telomerase (cancer)	I	Geron
<b>LY2275796</b>	eIF4E (cancer)	I	Lilly/Isis
<b>LY21181308</b>	surviving (cancer)	I	Lilly/Isis
<b>TD101</b>	Keratin 6a in PC	I	TransDerm
<b>CALAA-01</b>	M2 ribonucleotide reductase (solid tumors)	I	Calando Pharmaceuticals
<b>NUCB1000</b>	HBV	I	Nucleonics
<b>ISIS 301012</b>	apoB-100 (high cholesterol)	II	ISIS
<b>ISIS 113715</b>	PTP1B (diabetes)	II	ISIS
<b>Alicaforsen</b>	ICAM1 (ulcerative colitis)	II	ISIS
<b>ATL1102</b>	VLA4 (multiple sclerosis)	II	ATL/ISIS
<b>OGX-011</b>	clusterin (prostate cancer)	II	OncoGenexISIS
<b>SPC2996</b>	BCL2 (B-cell lymphoma)	II	Santaris
<b>Resten-NG</b>	MYC (restenosis)	II	AVI
<b>Bevasiranib</b>	Cand5 (VEGF ligand) in AMD, diabetic macular edema	C.A.R.E™ trial I-II	Acuity Pharmaceuticals
<b>Bevasiranib</b>	Cand5 (VEGF ligand)	II	Acuity Pharmaceuticals
<b>Genesense</b>	BCL2 (cancer)	III	Genta

**Tabella 12.** Farmaci a base di oligonucleotidi o siRNA in fasi di sperimentazione clinica <sup>[119,127,128,138,141,164]</sup>.

### 3.3 Design

I siRNA vengono convenzionalmente disegnati come nella loro naturale struttura derivante dal meccanismo di interferenza fisiologica, cioè due filamenti complementari di 19 basi con due nucleotidi protrudenti ad entrambe le estremità 3', per un totale di 21 basi in ogni filamento <sup>[135,174-178]</sup>. I nucleotidi protrudenti sono solitamente dTdT in quanto sono più resistenti all'attacco da parte delle nucleasi, e si cercano sequenze bersaglio precedute dal dinucleotide AA per aumentare la specificità dell'appaiamento. Recentemente sono anche stati messi a punto siRNA di dimensioni diverse, per esempio 23 o 27 basi, o con estremità non protrudenti <sup>[179,180]</sup>.

I siRNA, come i primer o le sonde, dovrebbero contenere una percentuale di coppie CG di circa il 30-50%, o al massimo 30%-70%, e non più di 4 G o C consecutive, in quanto l'eccessiva stabilità termodinamica conferita da queste basi può interferire con il processo di silenziamento <sup>[177]</sup>. La stabilità interna del siRNA viene valutata in stabilità termodinamica ( $\Delta G$ ), in particolare un siRNA ottimale possiede:

- bassa stabilità all'estremità 5'antisenso e maggiore stabilità all'estremità 5'senso. Si assume che l'asimmetria termodinamica e quindi la maggiore flessibilità del duplex in 5' dell'antisenso guidi il RISC nel corretto svolgimento del siRNA e trattenimento del filamento antisenso <sup>[181]</sup>;
- bassa stabilità interna nella regione nucleotidica 9-14 (contata a partire dal 5' antisenso). Essa corrisponde infatti alla regione dell'mRNA target in cui normalmente avviene il taglio enzimatico.

Sono attualmente disponibili diversi programmi per il disegno di siRNA

(Tabella 13) [174,176,181-185]

Name	Sponsor/host	URL
Ambion siRNA Target Finder	Ambion Inc	<a href="http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html">http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html</a>
Jack Lin's siRNA Sequence Finder	Cold Spring Harbor Laboratory	<a href="http://www.sinc.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html">http://www.sinc.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html</a>
siDESIGN Center	Dharmacon Inc	<a href="http://www.dharmacon.com/sidesign/default.aspx">http://www.dharmacon.com/sidesign/default.aspx</a>
LASSO	Ecole de Mines de Paris	<a href="http://cbio.ensmp.fr/dsir">http://cbio.ensmp.fr/dsir</a>
siRNA Target Finder	GenScript Corp	<a href="http://www.genscript.com/rnai.html">http://www.genscript.com/rnai.html</a>
Imgenex siRNA Designer	Imgenex Corp	<a href="http://imgenex.com/sirna_tool.php">http://imgenex.com/sirna_tool.php</a>
EMBOSS siRNA	Institute Pasteur	<a href="http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/sirna.html">http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/sirna.html</a>
IDT RNAi Design (SciTools)	Integrated DNA Technologies Inc	<a href="http://www.idtdna.com/SciTools/Applications/RNAi/RNAi.aspx">http://www.idtdna.com/SciTools/Applications/RNAi/RNAi.aspx</a>
BLOCK-IT RNAi Designer	Invitrogen Corp	<a href="https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/">https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/</a>
SiSearch	Karolinska Institute	<a href="http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.7.html">http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.7.html</a>
DEQOR	Max Plank Institute	<a href="http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html">http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html</a>
SIMAX	MWG-Biotech Inc	<a href="http://www.mwg-biotech.com/html/s_synthetic_acids/s_sirna_design.shtml">http://www.mwg-biotech.com/html/s_synthetic_acids/s_sirna_design.shtml</a>
BIOPREDsi	Novartis Institutes for BioMedical Research	<a href="http://www.biopredsi.org/start.html">http://www.biopredsi.org/start.html</a>
Promega siRNA Target Designer	Promega Corp	<a href="http://www.promega.com/siRNADesigner/default.htm">http://www.promega.com/siRNADesigner/default.htm</a>
QIAGEN siRNA Design Tool	QIAGEN Inc	<a href="http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx?">http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx?</a>
SDS/MPI	University of Hong Kong	<a href="http://i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php">http://i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php</a>
OptiRNA	University of Nebraska-Lincoln	<a href="http://optirna.unl.edu/">http://optirna.unl.edu/</a>
SiDRM	University of New Mexico	<a href="http://sirecords.unm.edu/siDRM/">http://sirecords.unm.edu/siDRM/</a>
WI siRNA Selection Program	Whitehead Institute	<a href="http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/">http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/</a>
siRNA selector	Wistar Institute	<a href="http://hydra1.wistar.upenn.edu/Projects/siRNA/siRNAindex.htm">http://hydra1.wistar.upenn.edu/Projects/siRNA/siRNAindex.htm</a>

Tabella 13. Programmi per il disegno di siRNA [181].

Per verificare la specificità della sequenza, cioè che sia complementare solo all'mRNA bersaglio e non dia effetti aspecifici (off-target effects, OTE), si effettua una ricerca sui programmi per l'allineamento di sequenze BLAST [186] o BLAT [187].

Anche la struttura secondaria dell'mRNA è importante da valutare per produrre siRNA maggiormente efficiente. Infatti, è necessario che l'mRNA sia accessibile ai siRNA, e la struttura secondaria, composta da forcine e loop e sequenze a filamento singolo o doppio, gioca un ruolo fondamentale nel determinare l'attività dei siRNA. La presenza di strutture secondarie può

impedire anche l'appaiamento del filamento antisenso del siRNA e la formazione del complesso con RISC.

Per determinare la struttura secondaria dei siRNA si utilizzano programmi specifici quali sFOLD <sup>[188]</sup> e mFOLD <sup>[189]</sup>.

#### 4. Modelli murini

I modelli animali utilizzati nella sperimentazione preclinica, di solito di topi, ratti o conigli, vengono utilizzati per validare nuove molecole destinate a diventare farmaci e per verificare le reazioni di un organismo vivente al trattamento con la molecola studiata <sup>[190-192]</sup>.

L'animale è utilizzato per valutare il profilo farmacologico e tossicologico della molecola per dimostrarne efficacia e sicurezza prima di poterla utilizzare sull'uomo.

Il modello animale deve essere il più rappresentativo possibile della patologia studiata e viene scelto in base al tipo di sperimentazione progettata:

- animali transgenici: animali in cui un gene esogeno (transgene) normale o mutato viene aggiunto al genoma ed espresso in uno specifico tessuto o in un determinato momento dello sviluppo;
- animali “knock-out”: animali in cui specifici geni endogeni sono mutati o completamente inattivati;
- animali geneticamente selezionati per una patologia;
- animali sottoposti a trattamenti che riproducano la patologia;
- animali immunodeficienti che possano ricevere cellule umane e tumorali senza rischio di rigetto (topi SCID) <sup>[193,194]</sup>.

Anche per quanto riguarda modelli animali di leucemie, si ritrovano in letteratura diversi esempi di topi transgenici o knock-out <sup>[195-201]</sup>.

Topi e ratti vengono utilizzati come modelli grazie alla loro somiglianza genetica con l'uomo, al loro breve ciclo riproduttivo e al loro facile mantenimento <sup>[202]</sup>. In ogni caso bisogna sempre considerare il principio di specificità di specie, per cui l'attività di una molecola dipende dall'organismo

in cui si trova, e non necessariamente l'efficacia in un organismo, per esempio il topo, implica l'attività anche in un altro, per esempio l'uomo. Per questo motivo sono necessarie le fasi di sperimentazione clinica anche nell'uomo.

La sperimentazione animale in Italia è controllata dal Ministero della Salute <sup>[203]</sup> che deve autorizzare qualsiasi protocollo sperimentale che prevede l'utilizzo di animali (Circolare del Ministero della Sanità n° 8 del 22 aprile 1994, D.L.vo 27 gennaio 1992, n° 116).

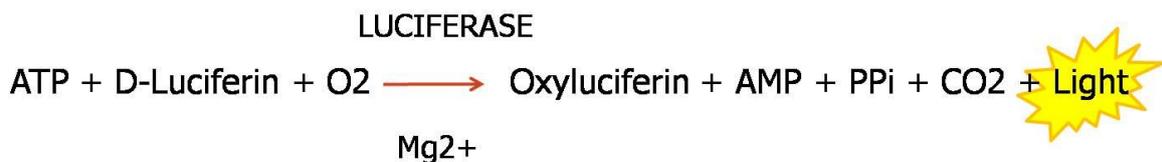
Vengono inoltre proposte linee guida per trovare tecniche alternative all'utilizzo di animali per la sperimentazione scientifica, secondo l'approccio delle 3 R: Reduction, Refinement, Replacement <sup>[204-206]</sup>:

- reduction: ridurre il numero degli animali utilizzati senza compromettere la qualità dei risultati;
- refinement: perfezionare la procedura riducendo la sofferenza e migliorando il benessere dell'animale;
- replacement: sostituire l'utilizzo di animali con metodiche alternative.

## 5. Imaging bioluminescente *in vivo*

L'imaging bioluminescente *in vivo* (bioluminescence imaging, BLI) è diventato uno strumento di grande utilità per valutare i processi fisiologici e patologici a livello cellulare e molecolare nei sistemi viventi [207-211]. BLI viene usato con successo nei piccoli animali da laboratorio per studiare differenti tipi di patologie e tumori [212-215], e qualcosa si sta cominciando a sviluppare anche nel campo ematologico [216-218].

BLI è basato sull'attività dell'enzima luciferasi, prodotto principalmente dalla lucciola *Photinus pyralis*, ma estratto successivamente anche da *Renilla reniformis*, *Gaussia princeps*, batteri... [210,219-221]. L'enzima luciferasi catalizza l'ossidazione del suo substrato, la D-luciferina, in presenza di ATP, ossigeno molecolare e  $Mg^{2+}$ , condizioni possibili solo in cellule e organismi vivi, con conseguente emissione di luce proporzionale all'espressione dell'enzima luciferasi (**Figura 17**).



**Figura 17.** Reazione bioluminescente dell'enzima luciferasi.

L'enzima luciferasi, non presente fisiologicamente negli altri organismi oltre a quelli menzionati sopra, può essere introdotta nelle cellule tramite trasfezione stabile sotto il controllo di un promotore costitutivo come simian virus 40 (SV40), citomegalovirus (CMV) o la sequenza long terminal repeat (LTR) dei retrovirus [222].

Per questi motivi, BLI è una metodica semplice, sensibile, che non necessita di ricorrere all'uso di radioisotopi, di contenuti costi, e che produce

un segnale virtualmente senza background in quanto l'emissione di luce dalla reazione luciferina/luciferasi è specifica a circa 612 nm a temperatura corporea <sup>[223]</sup>.

Per *in vivo* BLI, gli animali da laboratorio, che fisiologicamente non esprimono la luciferasi, possono essere modificati geneticamente tramite l'inserzione di un transgene a livello di blastocisti, o possono essere inoculati con cellule stabilmente trasfettate con il gene della luciferasi <sup>[224]</sup>; il substrato D- luciferina viene iniettato intraperitoneo o sottocute <sup>[225]</sup>, e l'emissione di luce derivante dalla reazione luciferina/luciferasi viene captata tramite una ultrasensibile charge-coupled device (CCD) camera <sup>[225]</sup>. Il segnale bioluminescente è direttamente proporzionale al numero di cellule presenti, e permette di valutare la crescita e la proliferazione della patologia o del tumore.

*In vivo* BLI è una metodica rapida, non invasiva, per cui l'animale da laboratorio non subisce stress che possano alterare l'andamento dell'esperimento, permette monitoraggi ripetuti senza arrecare danni fisiologici all'animale. Inoltre, l'elevata sensibilità della metodica permette di rilevare la patologia o il tumore sia nei tessuti più profondi, sia in uno stadio molto precoce, e permette di mettere in atto subito una terapia adeguata, prima ancora che l'animale sviluppi segni di sofferenza a livello fisico <sup>[213]</sup>.

Inoltre, *in vivo* BLI può essere utilizzata sia per valutare la distribuzione *in vivo* di cellule ingegnerizzate con il gene per l'enzima luciferasi inoculate nell'animale <sup>[213-215,226]</sup>, sia per validare l'efficacia di una molecola o di un farmaco o di una terapia cellulare <sup>[227-232]</sup>, valutando le variazioni del segnale bioluminescente che sono direttamente proporzionali al numero di cellule presenti, senza che ciò comporti il sacrificio dell'animale, in quanto è una metodica non invasiva, con tempi di valutazione relativamente brevi, e con elevata sensibilità. Tale applicazione si può intendere anche per le molecole di nuova generazione come i siRNA <sup>[233-236]</sup>.

## SCOPO DEL LAVORO

Le Leucemie Acute Mieloidi di sottotipo FAB M4 e M5, le Leucemie Acute Linfoblastiche e le Leucemie Bifenotipiche sono frequentemente caratterizzate da traslocazioni del gene 11q23/MLL con formazione di oncogeni di fusione e produzione di oncoproteine che inducono la trasformazione neoplastica. Tali leucemie con riarrangiamenti di 11q23/MLL sono caratterizzate da prognosi infausta e scarsa responsività alle terapie convenzionali.

Data la necessità di trovare terapie efficaci per le leucemie con traslocazione di MLL, in questo lavoro di ricerca sono stati progettati, caratterizzati e validati siRNA per il silenziamento genico degli oncogeni di fusione di MLL, con lo scopo di valutare il ripristino delle normali funzionalità di differenziamento cellulare e l'arresto della proliferazione neoplastica.

Sono stati progettati siRNA specifici per gli oncogeni di fusione di MLL, sia per le regioni conservate nei diversi oncogeni di fusione, sia a livello del punto di fusione (*breakpoint*), sia per le regioni sui geni partner.

I siRNA sono stati valutati su linee cellulari contenenti diverse traslocazioni del gene MLL. Il silenziamento è stato valutato sia a livello cellulare in termini di riduzione della capacità proliferativa e del numero delle cellule leucemiche, sia a livello molecolare tramite l'analisi della diminuzione dell'mRNA degli oncogeni di fusione di MLL.

E' stata valutata la diminuzione delle oncoproteine di fusione di MLL in seguito a trattamento con siRNA.

E' stata analizzata la variazione dell'espressione di geni dipendenti da MLL in seguito a trattamento con siRNA.

Sono stati messi a punto modelli murini bioluminescenti di leucemie acute con traslocazioni di MLL innanzitutto per studiare il *trafficking in vivo* e la progressione leucemica delle leucemie acute con traslocazione di MLL. Successivamente sono stati utilizzati i modelli murini per lo studio *in vivo* dell'efficienza e della tossicità dei siRNA progettati e validati *in vitro*, valutando diversi sistemi di *delivery* per i siRNA *in vivo*.

## MATERIALI E METODI

Per ogni trattamento riportato di seguito sono stati effettuati almeno tre esperimenti biologici indipendenti.

### 1. Linee Cellulari

Sono state utilizzate linee cellulari con diverse traslocazioni 11q23/MLL, derivate da cellule di leucemia umana bloccate in particolari fasi del processo differenziativo mielomonocitico (**Tabella 14**). Le linee cellulari sono state acquistate dalla banca DSMZ (Braunschweig, Germany).

Linea cellulare	Leucemia	Traslocazione	Terreno di coltura
THP-1	LAM M5	MLL/AF9	RPMI 10% FBS
MOLM-13	LAM M5a	MLL/AF9	RPMI 10% FBS
MM6	LAM M5	MLL/AF9	RPMI 10% FBS, 1% OPI
NOMO-1	LAM M5a	MLL/AF9	RPMI 10% FBS
SEM	LAL	MLL/AF4	ISCOVE 10% FBS
RS4;11	LAL-L2	MLL/AF4	RPMI 10% FBS, 1mM HEPES
KOPN-8	LAL-B	MLL/ENL	RPMI 20% FBS
ML-2	LAM M4	MLL/AF6	RPMI 10% FBS
KARPAS-45	LAL-T	MLL/AFX	RPMI 20% FBS

**Tabella 14.** Linee cellulari utilizzate.

Tutti i terreni contenevano 1% L-Glutammina e 1% penicillina/streptomina (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY). Le cellule sono state mantenute in fiasche di polistirene T25 o T75 (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA) ad una concentrazione di  $2-5 \times 10^5$ /ml, in incubatore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Per mantenere ed amplificare le cellule in

coltura sono state effettuate diluizioni 2-3 volte a settimana: il mezzo è stato sostituito centrifugando le cellule a 1200 rpm per 5 minuti, quindi è stato eliminato il sovrantante e aggiunto nuovo terreno preriscaldato a 37°C.

## 2. Design dei siRNA

I siRNA sono stati disegnati tramite software bioinformatici secondo i criteri di Tuschl *et al.* [176], e Reynold *et al.* [177] descritti in precedenza. Sono stati utilizzati i software gratuiti sFOLD [188], mFOLD [189], SDS [182]. Sono stati disegnati siRNA a doppio filamento di 19 basi più 2 basi overhangs dTdT in posizione 3' di entrambi i filamenti.

I siRNA sono stati disegnati per avere come bersaglio la regione di MLL conservata nell'oncogene di fusione nella linea cellulare MLL. Sono stati inoltre disegnati siRNA sulla la regione a cavallo del *breakpoint* o sulle regioni appartenenti ai diversi geni partner. Non vengono riportate le sequenze dei siRNA in quanto ancora coperte da segreto professionale.

Il siRNA migliore con bersaglio la regione conservata di MLL è stato valutato sulle altre linee cellulari con traslocazione di MLL.

Oltre ai siRNA disegnati per il gene MLL (MWG, Ebersberg, Germany), sono stati utilizzati un siRNA scrambled o non targeting (SCR) come controllo negativo, ed un siRNA diretto contro la proteina Lamina A/C come controllo positivo (Dharmacon, Lafayette, CO) (**Tabella 15**).

siRNA	Sequenza filamento senso 5'-3'	Posizione
SCR	UAGCGACUAAACACAUCAAdTdT	Sia per uomo che per topo
Lamin A/C	GGUGGUGACGAUCUGGGCUUU	Lamina (sia per uomo che per topo)

**Tabella 15.** siRNA utilizzati.

### 3. Trattamento con siRNA

I siRNA sono stati introdotti nelle cellule con la metodica dell'elettroporazione tramite lo strumento Nucleofector (Amaxa-Lonza, Basel, Switzerland) secondo il protocollo. Sono state utilizzate  $1 \times 10^6$  cellule, sono state centrifugate a 1000 per 10 minuti, poi il sovrantante è stato scartato. Le cellule sono state risospese in 105  $\mu$ l di soluzione per nucleofezione (Kit Ingenio Electroporation Solution, Mirus Bio LLC, Madison WI). E' stato aggiunto il siRNA specifico in concentrazione 3,6  $\mu$ M, è stata messa la sospensione cellulare in una cuvetta nello strumento ed è stato azionato il programma specifico per ogni linea cellulare (**Tabella 16**).

Linea cellulare	Programma di nucleofezione
THP-1	V-01
MOLM-13	M-01
MM6	S-01
NOMO-1	S-01
SEM	V-01
RS4;11	T-16
KOPN-8	M-01
ML-2	A-07
KARPAS-45	T-01

**Tabella 16.** Programma di nucleofezione utilizzati.

La sospensione è stata immediatamente risospesa con 500  $\mu$ l di terreno nuovo preriscaldato a 37°C e piastrata in 1,5 ml di terreno nuovo preriscaldato a 37°C in piastre da 6 pozzetti. Le piastre sono state messe in incubatore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> per 4 ore. Successivamente le cellule sono state diluite con terreno nuovo e preparate per due tipi di esperimenti:

a) sono stati piastrati 100  $\mu$ l di ogni campione in triplicato in piastra da 96 pozzetti per ogni time point per le analisi di vitalità cellulare (24-144 ore);

b) le rimanenti cellule sono state conservate in fiasca in incubatore a 37°C per estrazione dell'RNA per i time point 24 e 48 ore.

#### **a) Valutazione della vitalità cellulare**

Tale analisi è stata effettuata mediante la metodica di bioluminescenza dell'ATPlite (Perkin Elmer, Warrington, U.K.), che valuta la vitalità cellulare in base alla quantità di ATP presente nelle cellule.

I campioni sono stati lisati con 50  $\mu$ l di buffer di lisi e agitati su shaker orbitale per 5 minuti. E' stato aggiunto il substrato (50  $\mu$ l) contenente luciferina e luciferasi, rispettivamente substrato ed enzima della reazione in **Figura 17**.

La piastra è stata posta in agitazione su shaker orbitale per 5 minuti, poi incubata al buio per 10 minuti. Infine è stata analizzata la luminescenza emessa dai campioni in seguito alla reazione al luminometro Infinite®200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). In base a questa reazione, la quantità di ATP è direttamente correlata con il numero di cellule dei campioni.

#### **b) Estrazione dell'RNA**

L'RNA totale delle cellule è stato estratto dopo 24 e 48 ore dai campioni utilizzando RNeasy Mini Kit (250) (Qiagen, Hilden, Germany). Per l'estrazione è stato seguito il protocollo proposto dalla ditta fornitrice del kit:

- le cellule sono state centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti;
- il sovrantante è stato scartato, il pellet è stato risospeso in PBS per eliminare il più possibile il terreno di coltura, la cui presenza avrebbe

potuto ridurre l'efficienza di estrazione, ed è stato centrifugato a 1200 rpm per 5 minuti;

- il sovranatante è stato scartato ed il pellet è stato risospeso in 350  $\mu$ l del buffer di lisi RLT e omogenizzato con ago 20G;
- al lisato sono stati aggiunti 350  $\mu$ l di etanolo al 70%, 700  $\mu$ l di tale miscela sono stati trasferiti in una RNeasy mini column e centrifugati per 15 secondi a 10000 rpm; il liquido precipitato è stato scartato;
- l'RNA recuperato sulla resina della colonna è stato sottoposto a lavaggio con 350  $\mu$ l di buffer RW1 e centrifugato per 15 secondi a 10000 rpm; il liquido precipitato è stato scartato;
- è stata aggiunta DNasi (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) per eliminare eventuali tracce di DNA: la mix comprendeva 44  $\mu$ l di acqua RNase-free, 5  $\mu$ l di buffer e 1  $\mu$ l di DNasi; è stato incubato per 15 minuti a temperatura ambiente;
- è stato effettuato un altro lavaggio con buffer RW1 e centrifugato per 15 secondi a 10000 rpm; il liquido precipitato è stato scartato;
- sono stati effettuati 2 lavaggi entrambi con 500  $\mu$ l di buffer RPE, il primo con centrifuga di 15 secondi a 10000 rpm, il secondo di 2 minuti a 10000; il liquido precipitato è stato scartato;
- è stata effettuata una centrifuga ulteriore di 1 minuto a 14000 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 40  $\mu$ l di Rnase-free water e centrifugato per 1 minuto a 10000 rpm per fare eluire l'RNA dalla colonna alla eppendorf.

La quantità totale di RNA recuperato è stata poi valutata tramite lettura allo spettrofotometro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) ad una lunghezza d'onda di 260 nm.

#### 4. RT-PCR

L'RNA così recuperato è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando la retrotrascrittasi inversa Superscript™ (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

Per la miscela di reazione sono state preparate tre mix:

- la prima costituita da 10 µl contenenti 1 µg di RNA estratto, dNTP 10 mM, Random Hexamers 0,4 µM e acqua sterile per portare a volume;
- tale mix è stata posta in termociclatore (PTC 225; Mj Research, Watertown, MA) a 65°C per 5 minuti (per denaturare l'RNA) e di seguito a 4°C per 1 minuto;
- la seconda mix era costituita da buffer 5X 10 mM comprensivo di MgCl<sub>2</sub> 25 mM, DTT 0.1 M, RNase OUT 40 U/µl; questa seconda mix è stata aggiunta alla prima e il tutto è stato posto in termociclatore a 42°C per 2 minuti;
- a questo punto è stato aggiunto alla miscela di reazione l'enzima Superscript™ 50 U/µl e la retrotrascrizione è stata effettuata con il seguente programma: 42°C per 50 minuti e 72°C per 15 minuti per inattivare l'enzima.

I cDNA sono stati conservati a 4°C.

#### 5. Real-Time PCR

La PCR quantitativa Real-Time è stata realizzata utilizzando la metodica SybrGreen con lo strumento LC480 (Roche). E' stata eseguita una PCR quantitativa assoluta, in cui la quantità di cDNA dei geni in studio è stata rapportata a quella del cDNA dei geni housekeeping β-actina e GAPDH, usati come geni di controllo endogeno, per la normalizzazione dei dati. Sono stati calcolati quindi ΔCt, ΔΔCt e Log Ratio: i ΔCt sono determinati dalla

sottrazione del valore medio della media dei Ct dei geni housekeeping al valore medio di Ct del gene in esame; i  $\Delta\Delta Ct$  rappresentano la deviazione standard dei valori dei  $\Delta Ct$  e sono ottenuti sottraendo al  $\Delta Ct$  del gene in esame il  $\Delta Ct$  del gene di controllo; il LogRatio è dato da  $-(\Delta\Delta Ct)$ .

La miscela di reazione per l'amplificazione è costituita da Fast Start SybrGreen PCR Master Mix 2X (Roche), 15 ng di cDNA e primer in concentrazione specifica per ogni coppia (**Tabella 17**), per un volume finale di 20  $\mu l$ , nel termociclatore LC480 Lightcycler (Roche).

Per ogni campione sono stati effettuati due replicati per ridurre gli eventuali errori compiuti dall'operatore. L'analisi successiva è stata effettuata sulla media dei due valori.

Le condizioni di PCR seguite sono: 95° per 10 minuti; 50 cicli di 95° per 10 secondi, 60°C per 15 secondi, 72°C per 15 secondi; 95°C per 1 secondo, 60°C per 10 secondi, 90°C continuo, 40°C per 1 secondo.

Primer	Bersaglio	Sequenza	Concentrazione nM
MLLwt senso	Tutte le linee	TGTGAACTGTACTGAGCGGCACC	200
MLLwt antisenso		TCGGGATTTAAGTCTGGAGGCTTG	800
MLL senso	THP-1, MM6	AACCACTCCTAGTGAGCCCAAGAA	200
AF9 antisenso		CCTGGTCTGGGATGGTGTGAA	200
MLL senso	MOLM-13	AGCACTCTCTCCAATGGCAATAGT	500
AF9 antisenso		AAGGACCTTGTGCCTGGTCTG	500
MLL senso	NOMO-1	TCCAATGGCAATAGTTCTAAGCA	600
AF9 antisenso		CCTGGTCTGGGATGGTGTGAA	600
AF9wt senso	THP-1, MM6, MOLM-13, NOMO-1	GCGCACCACCACTGATACTCA	200
AF9wt antisenso		CCTGGTCTGGGATGGTGTGAA	200
MLL senso	SEM, RS4;11	GCCCAAGTATCCCTGTAAAACA	800
AF4 antisenso		TAGGGAAAGGAAACTGGATGG	800
AF4wt senso	SEM, RS4;11	CAGAAGCCCACGGCTTATGT	500
AF4wt antisenso		TATTGCTGTCAAAGGAGGCGG	500
MLL senso	KOPN-8	CACCAGAATCAGGTCCAGAGCA	600
ENL antisenso		TCCTTGCTGTGGTTCTGGGAT	600
ENLwt senso	KOPN-8	AAGCAGAAGAAGAGCAGCTCGAA	500
ENLwt antisenso		GTTCTGGGATGGCTCGAAGTCT	500
MLL senso	ML-2	CACCAGAATCAGGTCCAGAGCA	600
AF6 antisenso		AGTGGTGGCAGTACTAGAGACC	600
MLL senso	KARPAS-45	AGAGTGGACTTTAAGGAGGATT	500
AFX antisenso		CGTTGTGAACCTTGATGAACTT	500
Lamin A/C senso	Tutte le linee	AGCTGAAAGCGCGCAATACCAAG	200
Lamin A/C antisenso		AGTTGCTTCTTGGCCTCACCTAGGG	200
$\beta$ -actina senso	Tutte le linee	TCCTCCTGGAAGAAGAGCTACGAG	200
$\beta$ -actina antisenso		ACACGGAGTACTTGCCTCAGG	200
GAPDH senso	Tutte le linee	CCAATATGATTCCACCCATGGC	300
GAPDH antisenso		CTTGATTTGGAGGGATCTCGC	300

**Tabella 17.** Primer per Real-Time PCR.

## **6. *Gene expression***

L'analisi di Real-Time PCR è stata effettuata sui campioni estratti alle 48 ore per valutare l'andamento di geni disregolati da riarrangiamenti di MLL.

Le condizioni di PCR sono come descritte sopra, con i primer riportati in **Tabella 18**.

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata tramite il programma MeV\_4\_3\_02.

<b>Primer</b>	<b>Sequenza</b>	<b>Concentrazione nM</b>
HOXA7 senso	CCAATTTCCGCATCTACCCCTGGA	800
HOXA7 antisenso	CTTCTTCCACTTCATGCGGCGGT	200
HOXA9 senso	ATCGATCCAATAACCCAGCAG	600
HOXA9 antisenso	CATTTTCATCCTGCGGTTCTGG	600
HOXA10 senso	CTGATGAATCTCCAGGCGAC	500
HOXA10 antisenso	AGCCCTGCACAGATGTAACG	500
MEIS1 senso	GTTGAAGTAGGAAGGGAGCCA	600
MEIS1 antisenso	TGGCGTTGGTATGAGCTGT	600
ADAM10 senso	GCAACATCTGGGGACAACT	300
ADAM10 antisenso	CCACAAATAGGTTGGCCAGA	300
p21 senso	CACTGTCTTGTACCCTTGTGCC	300
p21 antisenso	TAGGGCTTCTCTTGGAGAA	300
CD44 senso	GACTCTGCCTCGTGCCGCTG	300
CD44 antisenso	GGCCATTGTGGGCAAGGTGC	300
FKHR senso	CAAGAGCGTGCCCTACTTCA	500
FKHR antisenso	TTCCCGCTCTTGCCACCCTC	500
FHIT senso	TGTCCTTGTGTGCCCGCTGC	300
FHIT antisenso	CTGTCCGGCTTCGGGGCCAT	300
FLT3 senso	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	600
FLT3 antisenso	CTTCAGCATTTTGACGGCAACC	600
FLT3LG senso	GCTTGTCTGGAGCGCGTGAA	500
FLT3LG antisenso	CCACCAGCTGCTCGGAGGTC	500
LMO2 senso	GTGGGGCGGCGCCTCTACTA	500
LMO2 antisenso	TCTGACAGGCGGCGCATTG	500
MYC senso	GCGACTCTGAGGAGGAACAAGA	900
MYC antisenso	AGTGGGCTGTGAGGAGGTTT	900

**Tabella 18.** Primer per Real-Time PCR.

## 7. Analisi proteica

Per effettuare l'analisi proteica, è stato effettuato un esperimento di nucleofezione con  $10 \times 10^6$  cellule, in particolare THP-1, SEM, KOPN-8 e MOLM-13 con campioni controllo, SCR e siMLL per ciascuna linea cellulare. Le proteine totali sono state estratte con CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (Sigma, St. Louis, MO) che permettesse la separazione della porzione nucleare da quella citoplasmatica.

La quantificazione delle proteine totali è stata effettuata allo spettrofotometro Nanodrop con programma per analisi BCA e lettura a 560 nm<sup>[237]</sup>.

Le proteine sono state corse su gel di poliacrilammide e analizzate tramite western blot per la rilevazione delle proteine specifiche.

Come proteina *housekeeping* è stata utilizzata la proteina  $\beta$ -tubulina. Per la rilevazione della proteina  $\beta$ -tubulina il gel di poliacrilammide è stato preparato in percentuale del 10%: ed è stato fatto correre a 120 V per circa 3 ore. Il trasferimento è stato effettuato con sistema iblot (Invitrogen). La membrana è stata incubata in Blocking solution (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) per un'ora in agitazione, poi con anticorpo primario anti-  $\beta$ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) per 3 ore, poi con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato a HRP (horse radish peroxidase). La rilevazione è stata effettuata con ECL advance (Amersham Life Science) nel luminometro Chemidoc (Biorad, Hercules, CA).

Per la rilevazione di MLL il gel di poliacrilammide è stato preparato in percentuale del 6% in quanto la proteina *wild-type* è di circa 450 KDa e le proteine di fusione tra 170 e 250 KDa circa, ed è stato fatto correre a 100 V per circa 3 ore. Il trasferimento è stato effettuato con sistema iblot (Invitrogen). La membrana è stata incubata in blocking solution (Amersham Life Science) per un'ora in agitazione, poi con anticorpo primario anti-MLL

(Santa Cruz) per 3 ore, poi con anticorpo secondario anti-mouse coniugato a HRP (horse radish peroxidase). La rilevazione è stata effettuata con ECL advance (Amersham Life Science) nel luminometro Chemidoc (Biorad).

## 8. Clonaggio

Per la generazione di cellule leucemiche luminescenti è stato utilizzato il plasmide pMMP-Lucneo contenente il gene dell'enzima luciferasi di lucciola *Photinus pyralis* (gentilmente concesso dal Prof. Andrew Kung, Harvard Medical School, Boston MA). Il plasmide è stato trasfettato con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in cellule packaging Phoenix per generare un vettore anfotropico retrovirale. Lo stock virale è stato raccolto 48 e 72 ore dopo la trasfezione ed è stato usato per infettare le cellule leucemiche THP-1, MOLM-13, SEM e KOPN-8 attraverso *spinoculation* (centrifugazione per 2 ore a 14000 rpm) in presenza di polybrene (hexadimethrine bromide, Sigma). Le cellule sono state incubate per 48 ore in terreno completo, poi selezionate per 15 giorni con 1mg/ml di G418 (Calbiochem, San Diego CA, USA). I cloni positivi sono stati visualizzati tramite reazione con luciferina (Luciferase Assay Reagent, Promega, Madison WI): sono state piastrate  $10^5$  cellule in 100  $\mu$ l di terreno in piastre da 96 pozzetti in seguito a conta cellulare con Trypan blue (Sigma), sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di luciferina ed è stato misurato il segnale al luminometro Infinite®200 (Tecan Group Ltd.). Sono stati scelti i cloni con la maggiore emissione e sono stati chiamati THP-1-*luc*, MOLM-13-*luc*, SEM-*luc*, KOPN-8-*luc*, rispettivamente.

Sono stati piastrati i cloni selezionati in triplicato in diluizioni seriali iniziando da  $10^5$  cellule in 100  $\mu$ l di PBS per valutare la relazione tra cellule, contate tramite Trypan blu (Sigma), e segnale bioluminescente: sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di luciferina e le cellule sono state analizzate per 1 min nella stessa regione di interesse (region of interest, ROI) con il luminometro LB981

(Berthold technologies, Wildbad, Germany). E' stata analizzata la regressione lineare per determinare la correlazione tra numero di cellule e intensità del segnale ( $R^2 > 0.98$ ,  $p < 0.001$ ,  $n=3$ ).

Lo spettro di emissione è stato misurato piastrando  $10^5$  cellule in 100  $\mu$ l di PBS in piastre da 96 pozzetti in seguito a conta cellulare con Trypan blue (Sigma), sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di luciferina ed è stato misurato lo spettro di emissione nell'intervallo di 560-670 nm, collezionando l'intensità di luce ogni 2 nm per 1 secondo con un lettore di spettri multimodale a piastre (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a temperatura ambiente (25°C).

## **9. Valutazione della bioluminescenza tramite siRNA**

Le linee cellulari ingegnerizzate con il gene della luciferasi sono state valutate per verificare che la trasfezione non causasse modificazioni nella risposta ai siRNA. E' stato utilizzato un siRNA disegnato contro il gene per la luciferasi (siRNA Luc): senso 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3', antisenso 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGTT-3'. Il siRNA è stato valutato nella linea cellulare THP-1-*luc* con la metodica dell'elettroporazione secondo il protocollo descritto in precedenza. L'efficienza di trasfezione è stata valutata tramite reazione con luciferina (Luciferase Assay Reagent) e analisi bioluminescente nello strumento Infinite®200 (Tecan Group Ltd.) come descritto in precedenza. L'analisi è stata effettuata ai tempi 0, 24 e 48 ore dalla nucleofezione.

## 10. Sviluppo di modelli murini *xenograft* di leucemie acute

Sono stati sviluppati quattro modelli murini bioluminescenti *xenograft* di leucemia acuta con riarrangiamenti del gene MLL utilizzando le linee cellulari THP-1-*luc*, MOLM-13-*luc*, SEM-*luc* e KOPN-8-*luc*. I modelli murini *xenograft* sono stati realizzati mediante l'utilizzo di topi NOD/SCID immunodeficienti (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) di circa 6 settimane. I topi sono stati stabulati in accordo con le linee guida internazionali e gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Università di Bologna.

Per valutare la cinetica di reazione del sistema luciferina-luciferasi *in vivo* sono stati inoculati topi con  $5 \times 10^6$  cellule THP-1-*luc* per via intravenosa nella vena caudale. I topi sono stati monitorati ogni 7 giorni mediante il luminometro LB981. Al 14° giorno dopo l'inoculo, i topi sono stati anestetizzati con isoflurano per via inalatoria (Gas Anesthesia System, Ugo Basile, Italia), è stata effettuata l'iniezione di 150mg/Kg di D-luciferina (D-luciferin potassium salt, Gold biotechnology, St. Luis, MO) per via intraperitoneale ed è stata effettuata la rilevazione al luminometro LB981 per 20 minuti con rilevazioni ogni minuto. Il picco di segnale bioluminescente è risultato essere 8-12 minuti dopo l'iniezione di D-luciferina, per cui è stato scelto come intervallo ottimale su cui basare gli esperimenti successivi <sup>[216]</sup>.

Per ciascun modello sono stati utilizzati almeno 10 topi, i quali sono stati inoculati con 5-15 milioni di cellule leucemiche per via endovenosa dalla vena caudale e monitorati ogni 7 giorni mediante il luminometro LB981. La rilevazione della luminescenza è stata effettuata singolarmente per ciascun topo previa anestesia gassosa con isoflurano ed iniezione intraperitoneale di D-luciferina alla concentrazione di 150mg/Kg come descritto in precedenza. I segnali bioluminescenti sono stati acquisiti per 3 minuti in posizione sia prona sia supina, e sono state effettuate immagini fotografiche dell'animale in

entrambe le posizioni. Il segnale bioluminescente è stato analizzato con il software Winlight 2.9 (Berthold technologies), il valore totale è stato calcolato come la somma dei segnali prono e supino in flusso di fotoni (fotoni al secondo, ph/s) da un'area ROI di 500 mm<sup>2</sup>, dopo sottrazione del background, ed è riportato come media  $\pm$  deviazione standard della media (standard error of mean, SEM).

I topi sono stati sacrificati nel momento in cui i segni di sofferenza erano non tollerabili, e sono stati prelevati loro sangue, midollo osseo, milza e fegato per le analisi cliniche e molecolari.

Con il sangue periferico sono stati allestiti strisci su vetrino colorati con metodica May-Grünwald-Giemsa (Sigma):

- alcuni microlitri di sangue sono stati strisciati su vetrino;
- il vetrino è stato immerso per 3 min nella soluzione May-Grünwald, poi sciacquato con acqua distillata;
- il vetrino è stato immerso per 7 min nella soluzione Giemsa, poi sciacquato con acqua distillata e lasciato asciugare;
- il vetrino è stato osservato al microscopio ottico.

Per effettuare un confronto, sono stati colorati con May-Grünwald-Giemsa anche campioni di cellule di controllo.

La milza dei topi sacrificati è stata fotografata e confrontata rispetto a quella di topi di controllo.

I tessuti midollo osseo, milza e fegato sono stati trattati con Trizol (Invitrogen) per l'estrazione dell'RNA:

- i campioni sono stati omogeneizzati in 1 ml di Trizol e incubati per 5 min a temperatura ambiente;

- sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio per ogni ml di Trizol, i campioni sono stati shakerati vigorosamente per 15 sec e incubati per 2-3 min a temperatura ambiente;
- i campioni sono stati centrifugati a 12000 g per 15 min a 4°C;
- è stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA e messa in una nuova eppendorf, ed è stata eliminata la fase organica;
- sono stati aggiunti 0,5 ml di isopropanolo per ogni ml di Trizol e i campioni sono stati incubati per 10 min a temperatura ambiente;
- i campioni sono stati centrifugati a 12000 g per 10 min a 4°C ed è stato eliminato il sovrnatante;
- è stata aggiunta DNasi (Roche) per eliminare eventuali tracce di DNA: la mix comprendeva 44 µl di acqua RNase-free, 5 µl di buffer e 1 µl di DNasi;
- i campioni sono stati incubati per 15 minuti a temperatura ambiente;
- è stato aggiunto 1 ml di etanolo 75% per ogni ml di Trizol ed è stato vortexato;
- i campioni sono stati centrifugati a 7500 g per 5 min a 4°C;
- il sovrnatante è stato eliminato ed i campioni sono stati lasciati asciugare all'aria per fare evaporare ogni eventuale traccia di etanolo;
- l'RNA è stato risospeso in 40 µl di acqua RNase-free.

La quantificazione e la reazione di RT-PCR sono state effettuate come già descritto in precedenza. In aggiunta sono stati utilizzati i seguenti primer topo-specifici:

mGAPDH	(murine	GAPDH)	senso	5'-
CCAAGGAGTAAGAAACCCTGGA-3',			antisenso	5'-
GGCCCCTCCTGTTATTATGG-3'.				

## **11. *Delivery in vivo***

Sono stati valutati diversi metodi di *delivery* di siRNA *in vivo*. I siRNA utilizzati *in vivo* sono stati forniti da Sigma-Aldrich.

Per entrambi i metodi, l'efficienza di *delivery* è stata valutata in termini di calo dell'mRNA, bioluminescenza e sofferenza dell'animale:

- per la valutazione dell'mRNA è stato utilizzato il siRNA contro il gene della Lamina (LMNA);
- per la valutazione della bioluminescenza sono stati utilizzati i siRNA SCR e MLL, rispettivamente;
- per la valutazione della sofferenza degli animali sono stati osservati segni fisici e la sopravvivenza.

### **a) *Hydrodynamic injection***

La *hydrodynamic injection* consiste nell'iniezione nella vena caudale dell'animale di un volume di soluzione fisiologica del 10% del peso corporeo dell'animale contenente i siRNA in circa 5-7 secondi, per creare un gradiente di pressione che possa far aprire le fenestrate dei vasi e i pori delle membrane, per permettere ai siRNA di uscire dal torrente circolatorio ed entrare in tessuti e cellule.

La metodica di *hydrodynamic injection* è stata valutata su topi inoculati con linea cellulare THP-1-*luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9.

I siRNA utilizzati sono stati siRNA MLL per la valutazione della bioluminescenza e siRNA LMNA per la valutazione dell'mRNA. L'analisi dell'mRNA è stata effettuata in seguito ad estrazione dell'RNA dei tessuti midollo osseo, fegato e milza dei topi trattati e non tramite metodica Trizol, quantificazione, RT-PCR e Real-TimePCR con protocolli come descritti in

precedenza. In aggiunta sono stati utilizzati i seguenti primer topo-specifici: mLMNA (murine LMNA) senso 5'-AGGCCTGAAGCCAAAGAAAA-3', antisenso 5'-AAGGGGAAGGACTTAGGATTGAG-3'.

## **b) PEI**

I siRNA sono stati complessati con soluzioni di polietilenimina, *in vivo*-jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France), per formare nanoparticelle specifiche per la *delivery in vivo*.

Sono stati diluiti 40 µg di siRNA in 200 µl di soluzione di glucosio al 5% e sono stati vortexati e centrifugati brevemente.

Sono stati diluiti rispettivamente 4, 6, 8, 10 µl di *in vivo*-jetPEI in 200 µl di soluzione di glucosio al 5% per avere soluzioni in rapporto N/P (N = moli di azoto del PEI, P = moli di fosfato del siRNA) rispettivamente di 4, 6, 8, 10, e sono stati vortexati e centrifugati brevemente.

La soluzione di *in vivo*-jetPEI è stata aggiunta alla soluzione di siRNA, e la soluzione finale è stata vortexata, centrifugata brevemente e lasciata a incubare per 15 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione delle nanoparticelle.

Le nanoparticelle sono state iniettate nella vena caudale dei topi.

La metodica di trasfezione con jetPEI è stata valutata su topi inoculati rispettivamente con le linee cellulari SEM-*luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4, KOPN-8-*luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-ENL, MOLM-13-*luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9.

Per la linea cellulare SEM-*luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4 sono stati valutati i seguenti siRNA:

siRNA SCR in rapporto con jetPEI NP = 10, 8, 6, 4;

siRNA Luc in rapporto con jetPEI NP = 10, 8, 6;

siRNA MLL in rapporto con jetPEI NP = 10, 6, 4.

Per la linea cellulare KOPN-8-*luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-ENL sono stati valutati i seguenti siRNA:

siRNA Luc in rapporto con jetPEI NP = 10;

siRNA MLL in rapporto con jetPEI NP = 10;

reagente JetPEI scarico (senza siRNA) come controllo di tossicità.

Per la linea cellulare MOLM-13-*luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9 sono stati valutati i seguenti siRNA:

siRNA SCR in rapporto con jetPEI NP = 10;

siRNA MLL in rapporto con jetPEI NP = 10;

reagente JetPEI scarico (senza siRNA) come controllo di tossicità.

# RISULTATI

## 1. Design dei siRNA

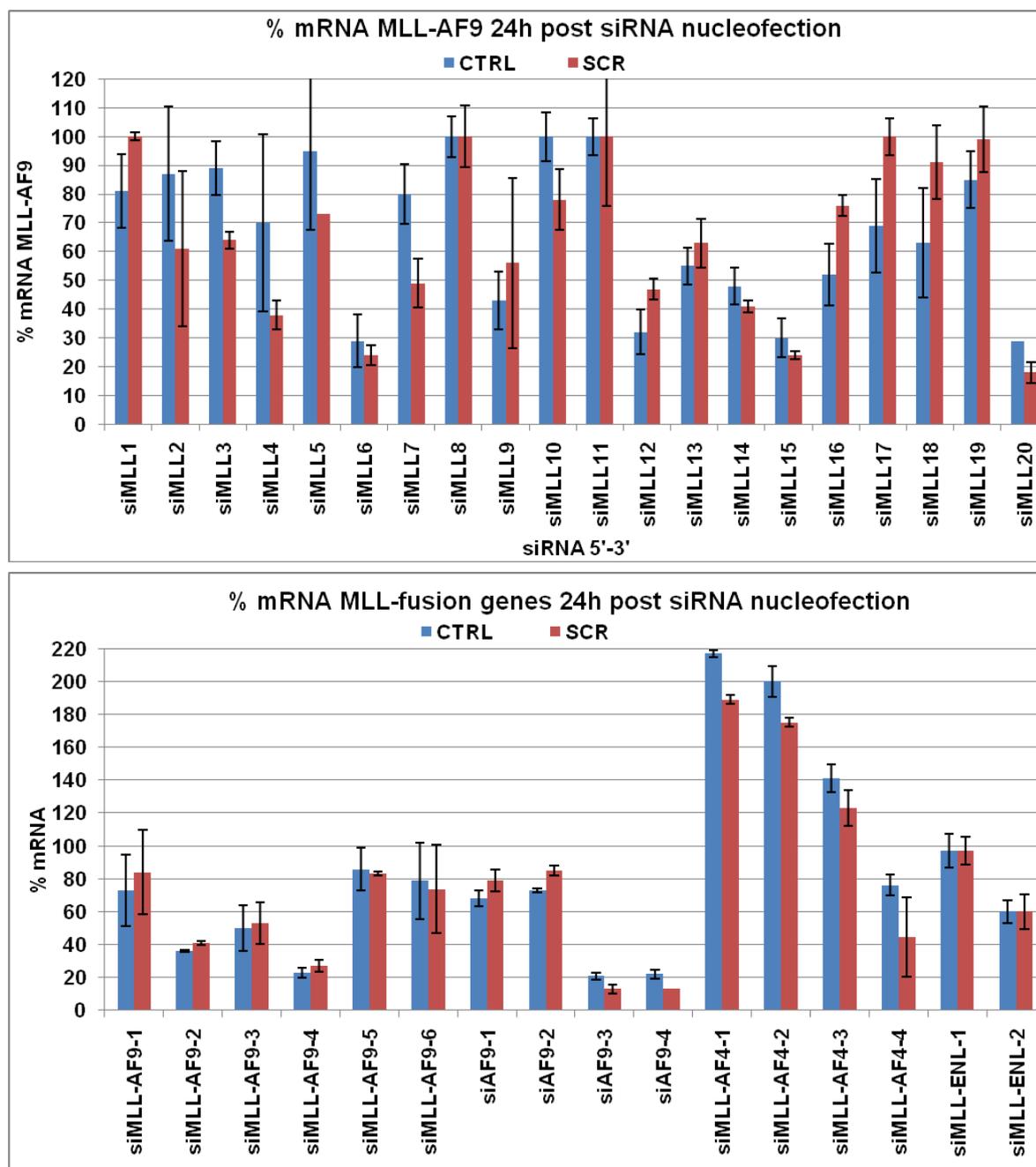
I software utilizzati per disegnare i siRNA hanno fornito sequenze che sono state scelte in base ai criteri di Tuschl *et al.* <sup>[176]</sup>, e Reynold *et al.* <sup>[177]</sup> descritti in precedenza (**Tabella 19**).

siRNA	Dinucleotide precedente in 5'	Contenuto GC	Energia di legame del siRNA antisenso ( $\Delta G$ , kcal/mol)	Differenza di stabilità tra le estremità 5' e 3' (DSSE, kcal/mol)	Stabilità interna media sul sito di taglio (AIS, kcal/mol)
siMLL1	CG	63,20%	-11,7	-4,2	-8,1
siMLL2	AA	42,10%	-4,3	0,7	-6,8
siMLL3	AA	52,60%	-4,5	3,9	-8,9
siMLL4	AA	52,60%	-2,3	6,4	-9,6
siMLL5	AA	52,60%	-4	3	-8,3
siMLL6	AA	47,40%	-7,8	3,4	-9,3
siMLL7	AA	47,40%	-7,5	1,5	-7,8
siMLL8	AA	52,60%	2,6	2,8	-9,8
siMLL9	AA	47,40%	-5	1,6	-8,2
siMLL10	AA	47,40%	-2,5	0,6	-9,6
siMLL11	AA	36,80%	-4,2	7,3	-8,7
siMLL12	GU	36,80%	-13,4	3,5	-6,7
siMLL13	GA	31,60%	-15,5	-0,4	-5,2
siMLL14	AA	42,10%	-2,1	3,8	-7,9
siMLL15	AA	47,40%	-3,3	3,7	-10,2
siMLL16	CC	31,60%	-21,8	6,4	-7,5
siMLL17	AC	36,80%	-23,8	1	-7,1
siMLL18	AA	36,80%	-25,1	0,2	-5
siMLL19	AA	36,80%	-24,6	-2,2	-8,8
siMLL20	AA	42,10%	-1,5	2,4	-9,4

**Tabella 19.** GC: valore ottimale 45-55%. DSSE (Differential stability of siRNA duplex ends, kcal/mol): stabilità delle ultime 4 basi dell'estremità 5' antisenso meno stabilità delle ultime 4 basi dell'estremità 5' senso. La regola dell'asimmetria è maggiore se il valore DSSE è  $> 0$ . AIS (Average internal stability, kcal/mol): media della stabilità interna dei valori delle posizioni 9-14 del filamento antisenso. Partendo da una posizione, la stabilità interna è per 4 BP stacks. La regola della stabilità relativa nel sito di taglio è rafforzata da valori di AIS  $> -8.6$  kcal/mol, con valori medi tra il minimo di -3,6 ed il massimo di -13,6.

L'esperimento pilota in cui sono stati valutati i siRNA scelti è stato effettuato sulla linea cellulare THP-1 (MLL-AF9) tramite nucleofezione con

il Programma V-01, come descritto nella sezione Materiali e Metodi (**Figura 18a,b**).



**Figura 18.** Analisi Real-Time PCR dell'mRNA dei geni di fusione di MLL a 24 ore dal trattamento.

I siRNA 1-20 sono stati disegnati sulla regione conservata di MLL, mentre i successivi siRNA sono stati disegnati sul *breakpoint* MLL-AF9 delle linee cellulari THP-1, MM6 e MOLM-13, su AF9, sul *breakpoint* MLL-AF4

delle linee cellulari SEM e RS4;11, sul *breakpoint* MLL-ENL della linea cellulare KOPN-8.

Dei 20 siRNA disegnati sulla regione conservata di MLL e valutati tramite analisi Real-Time PCR sulla linea cellulare THP-1, 5 hanno indotto un silenziamento del gene MLL-AF9 di più del 50%, e di questi 3 superiore al 70% (siMLL6, siMLL15, siMLL20).

I siRNA disegnati sul *breakpoint* MLL-AF9 hanno dato risultati diversi: i siRNA MLL-AF9 1, 5, 6 hanno indotto un silenziamento del gene MLL-AF9 di circa il 20%, mentre i siRNA MLL-AF9 2, 3, 4 hanno indotto un silenziamento di MLL-AF9 superiore al 40%.

Sono stati inoltre valutati siRNA disegnati sulla porzione AF9 delle linee con traslocazione MLL-AF9.

I siRNA disegnati sul *breakpoint* MLL-AF4 hanno dato risultati totalmente inaspettati, in quanto hanno paradossalmente indotto una sovraespressione dell'oncogene MLL-AF4. Sono quindi in corso ulteriori studi per approfondire tali risultati.

Dei due siRNA disegnati sul *breakpoint* MLL-ENL, uno non ha dato segni di un silenziamento efficace, mentre il secondo ha dato un silenziamento di MLL-ENL di circa il 40%.

Per le analisi sulle altre linee cellulari con traslocazione di MLL è stato scelto il siRNA che desse il migliore silenziamento e che fosse complementare alla regione di MLL conservata in tutte le traslocazioni. È stato quindi scelto il siRNA siMLL20 per tutti i successivi esperimenti.

I programmi di nucleofezione per la trasfezione dei siRNA utilizzati sulle diverse linee cellulari sono stati scelti in base all'efficienza ed alla minore tossicità possibile a carico delle linee cellulari.

## 2. Valutazione della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata analizzata tramite saggio di bioluminescenza (**Figure 19, 20**).

La linea cellulare di leucemia acuta mieloide MOLM-13 e le linee cellulari di leucemia acuta linfoblastica o bifenotipiche SEM, RS4;11, KOPN-8, KARPAS-45 hanno mostrato un calo del segnale bioluminescente che è correlato a un calo della cellularità nei campioni trattati con siRNA siMLL20 rispetto ai campioni di controllo o trattati con SCR. In particolare, le linee cellulari MOLM-13 e SEM hanno mostrato segni di risposta al siRNA siMLL20 già dal secondo giorno (48 ore) dopo il trattamento e si è mantenuto e accentuato fino alla fine degli esperimenti (giorni 6 e 7 a seconda della linea cellulare). Le linee cellulari RS4;11, KOPN-8 e KARPAS-45 hanno cominciato a mostrare segni di risposta al trattamento dal 5° giorno dopo il trattamento.

Le linee cellulari THP-1, MM6, NOMO-1 non sembrano avere risposto a stimoli antiproliferatori in seguito a trattamento con siRNA siMLL20.

La linea cellulare ML-2 mostra una diminuzione del segnale bioluminescente sia nei campioni trattati con siRNA siMLL20 sia in quelli trattati con SCR rispetto al controllo.

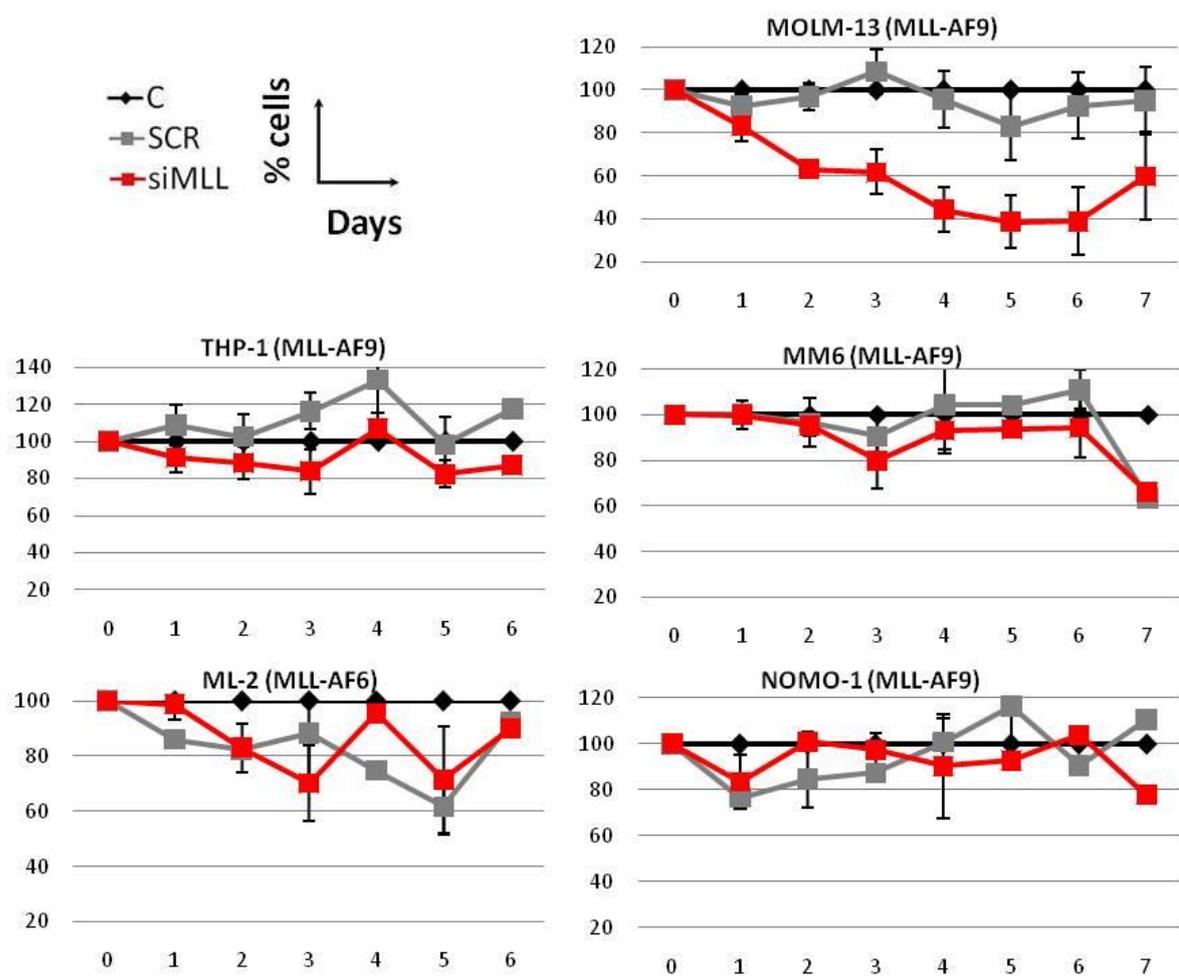


Figura 19. Analisi ATPlite in linee cellulari di leucemia acuta mieloide.

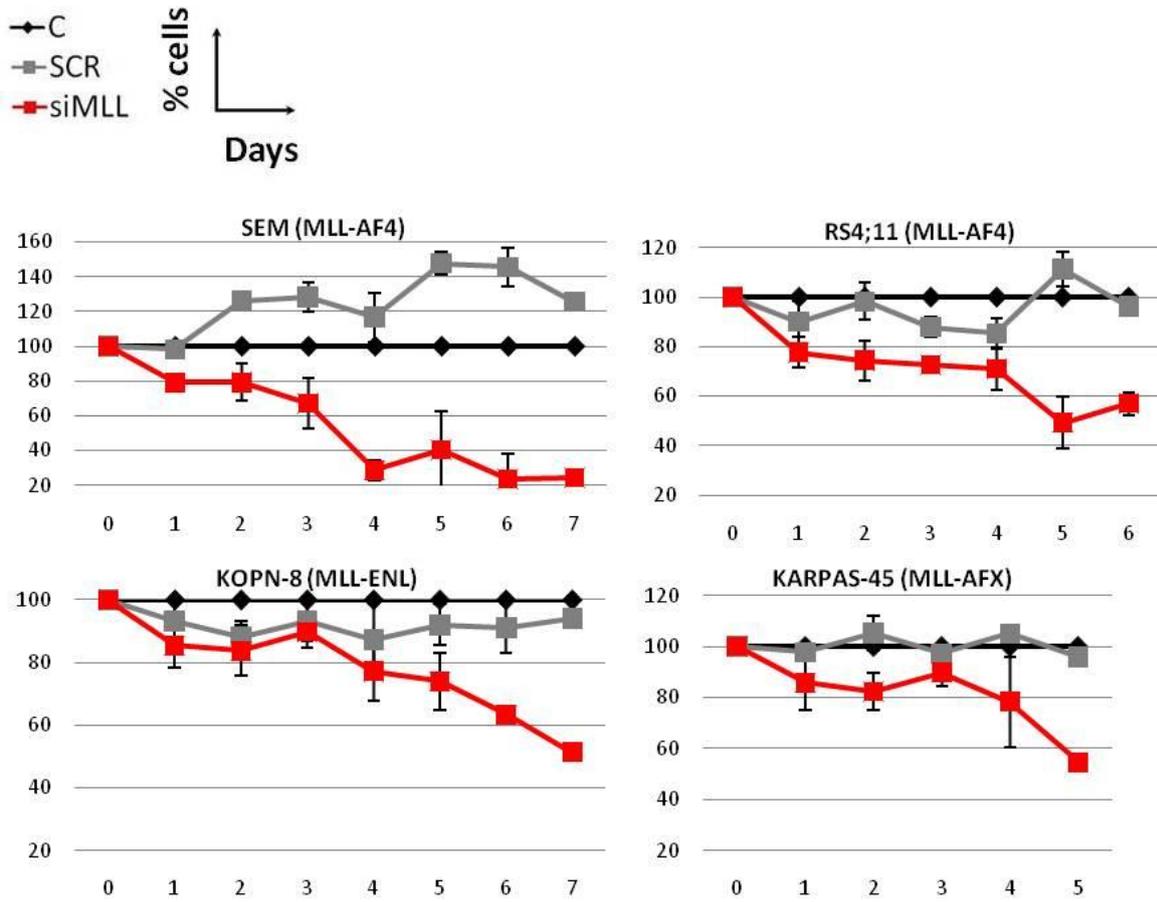


Figura 20. Analisi ATPlite in linee cellulari di leucemia acuta linfoblastica e bifenotipica.

### 3. Real-Time PCR

Le analisi di Real-Time PCR hanno evidenziato un calo dell'mRNA delle forme traslocate di MLL di più del 60% in seguito a trattamento con siRNA siMLL20 in tutte le linee cellulari tanne che nella linea ML-2 con traslocazione MLL-AF6 in cui ul calo è di circa il 30%. Il calo più significativo si ha nella linea cellulare THP-1 con traslocazione MLL-AF9 in cui il calo dell'mRNA di MLL-AF9 è di circa il 90% (**Figura 21**).

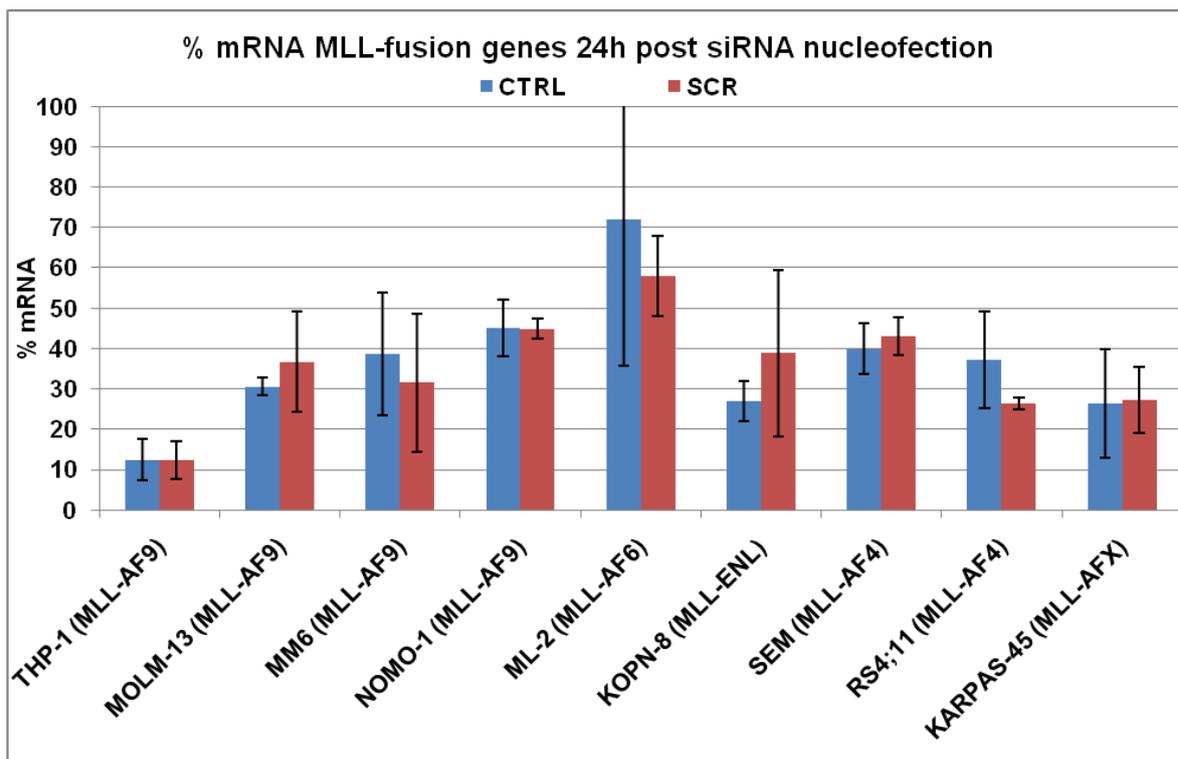


Figura 21. Analisi Real-Time PCR dell'mRNA dei geni di fusione di MLL.

E' stato valutato anche il calo dell'mRNA di MLL *wild type* (MLLwt) in quanto il siRNA siMLL20 è complementare ad una regione conservata sia in MLLwt che nelle forme traslocate. Tale analisi permette di valutare la tossicità aspecifica del siRNA. Si ha trascurabile calo dell'mRNA di MLLwt nelle linee cellulari di leucemia acuta linfoblastica o bifenotipica RS4;11 e SEM con traslocazione MLL-AF4 (<20%), e KOPN-8 con traslocazione

MLL-ENL (circa 30% rispetto CTRL, media del 130% rispetto a SCR, dato da riconfermare). Si ha calo di circa il 50% nella linea cellulare di leucemia acuta linfoblastica KARPAS-45 con traslocazione MLL-AFX e nella linea cellulare di leucemia acuta mieloide MM6 con traslocazione MLL-AF9. Si ha calo di circa il 60% rispetto a CTRL e 30% rispetto a SCR nella linea cellulare di leucemia acuta mieloide NOMO-1 con traslocazione MLL-AF9. Il calo è superiore al 70% nelle linee di leucemia acuta mieloide THP-1 e MOLM-13 con traslocazione MLL-AF9 e ML-2 con traslocazione MLL-AF6 (Figura 22).

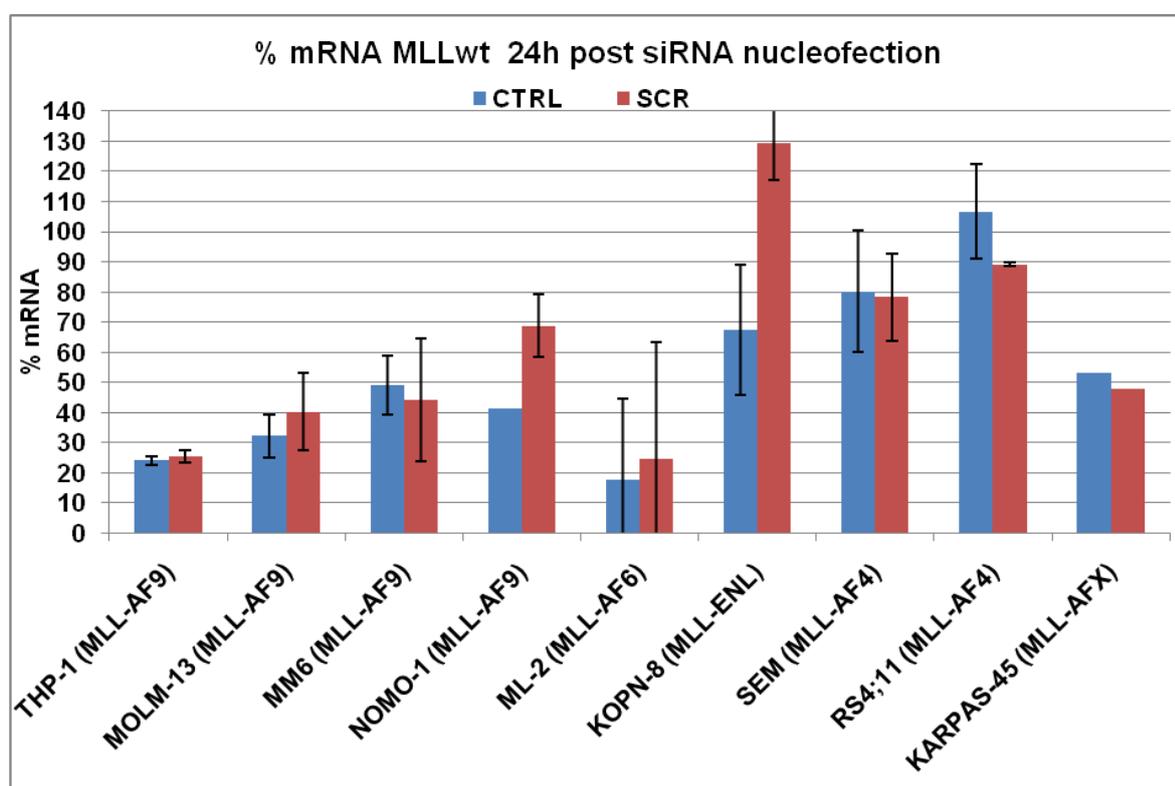


Figura 22. Analisi Real-Time PCR dell'mRNA di MLLwt.

#### 4. Gene expression

Sono state valutate le variazioni dei geni regolati da MLL in seguito a trattamento con il siRNA per MLL (**Figura 23**). Le analisi sono state effettuate dopo 48 ore dal trattamento con siRNA in seguito ad esperimenti preliminari che hanno valutato l'andamento dei geni ai tempi 24, 36, 48 e 72 ore dal trattamento. Il *time-point* risultato ottimale è stato 48 ore.

I geni HOXA e MEIS1 sono i principali bersagli di MLL. In condizioni fisiologiche vengono downregolati, mentre sono upregolati dalle oncoproteine di fusione di MLL in caso di leucemia con traslocazioni di MLL. In seguito a downregolazione delle forme traslocate di MLL con siRNA, i geni HOXA e MEIS risultano ritornare downregolati in tutte le linee cellulari, con eccezione della linea KARPAS-45 con traslocazione MLL-AFX e della linea ML-2 con traslocazione MLL-AF6. La linea cellulare KARPAS-45 riporta andamenti diversi dalle altre linee di leucemia mieloide con traslocazioni di MLL. Sono da approfondite tali divergenze.

Gli altri geni analizzati comprendono geni coinvolti nella trasduzione del segnale, nella regolazione del ciclo cellulare, nel differenziamento, nell'apoptosi.

Il gene FKHR risulta downregolato in tutte le linee cellulari tranne MOLM-13 con traslocazione MLL-AF9.

Il gene p21 risulta downregolato nelle linee di leucemia acuta linfoblastica o bifenotipica, mentre risulta diversamente regolato nelle linee di leucemia acuta mieloide.

I geni FLT3, FLT3LG, LMO2 e MYC risultano diversamente regolati senza una distinzione tra leucemia acuta mieloide o linfoblastica.

Il gene CD44 risulta upregolato in tutte le linee cellulari, con lieve eccezione di NOMO-1 con traslocazione MLL-AF9.

Il gene FHIT risulta upregolato in tutte le linee di leucemia acuta linfoblastica o bifenotipica, mentre risulta diversamente regolato nelle linee di leucemia acuta mieloide.

Il gene ADAM10 risulta mantenersi costante o leggermente upregolato in tutte le linee cellulari tranne KARPAS-45 con traslocazione MLL-AFX.

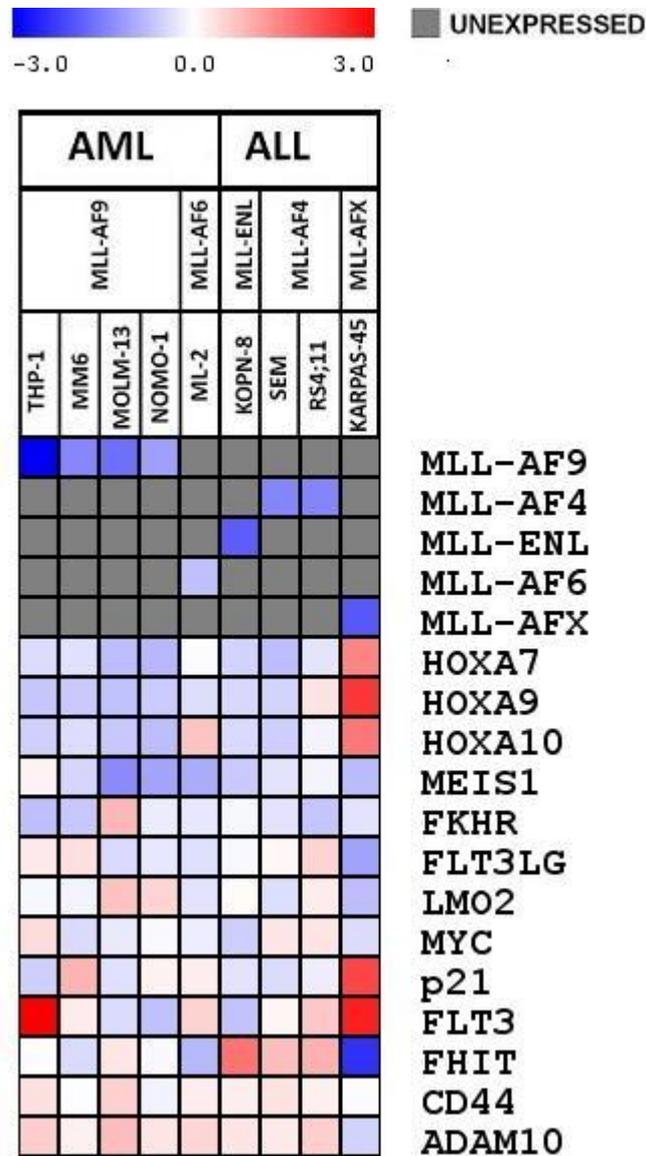
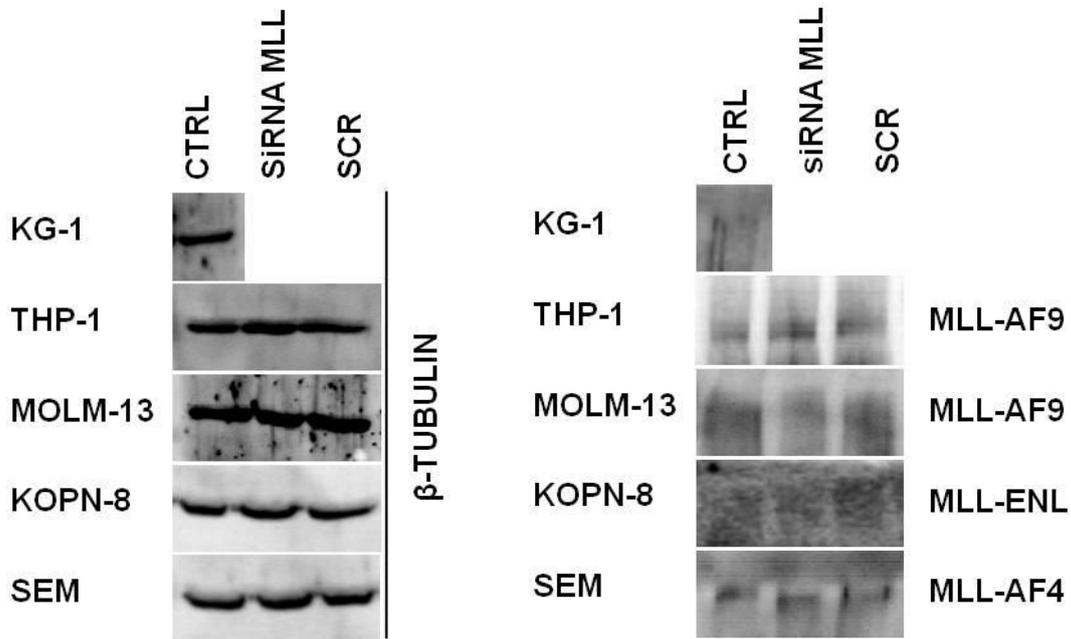


Figura 23. Espressione genica dei geni sotto il controllo di MLL.

## 5. Analisi proteica

L'analisi proteica è stata effettuata dopo 48 ore dal trattamento con siRNA per MLL e siRNA SCR tramite saggio western blot (**Figura 24**).



**Figura 24.** Western Blot dei campioni trattati con siRNA o SCR, rivelato con anticorpo anti- $\beta$ -tubulina o anti-MLL.

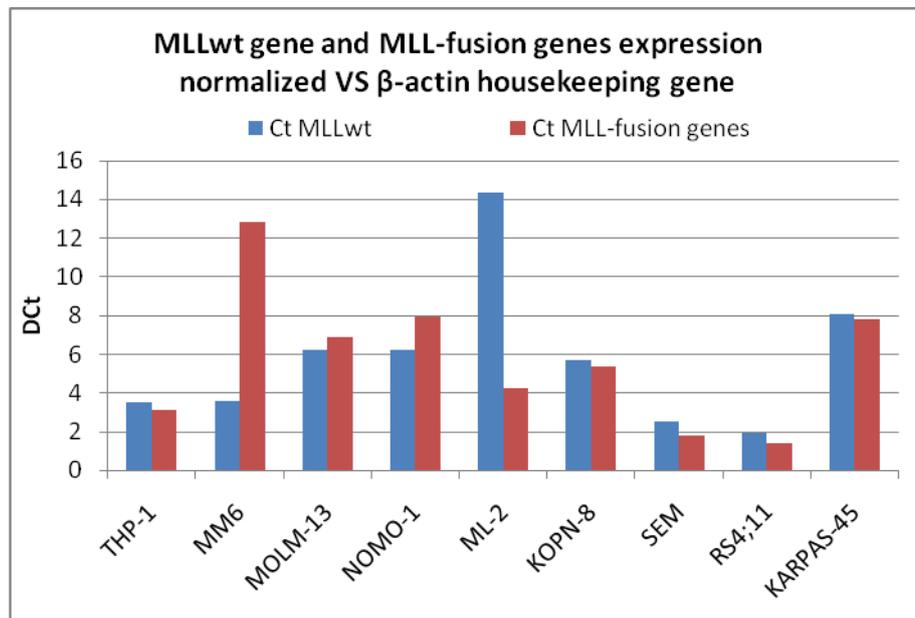
L'analisi proteica è stata effettuata sulle linee cellulari di leucemia acuta mieloide THP-1 e MOLM-13, e sulle linee di leucemia acuta linfoblastica o bifenotipica KOPN-8 e SEM. E' stata inoltre utilizzata una linea di leucemia senza traslocazione di MLL come controllo negativo.

La proteina *housekeeping*  $\beta$ -tubulina è risultata positiva per tutte le linee cellulari e in tutti i campioni.

La proteina MLL<sub>wt</sub> non è stata rilevata tramite western blot in quanto le sue dimensioni (485 KDa) eccedono la capacità di risoluzione del gel utilizzato e dei marker commerciali a disposizione.

Le oncoproteine di fusione sono risultate leggermente positive per tutte le linee cellulari analizzate, ma l'intensità della rilevazione è stata molto scarsa in quanto le oncoproteine MLL-AF9, MLL-ENL e MLL-AF4 sono

poco espresse a livello cellulare, anche nelle linee di leucemie acute con le rispettive traslocazioni di MLL (**Figura 25**).

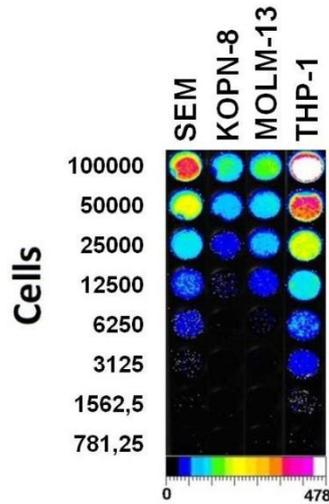


**Figura 25.** Valori di cicli soglia (Ct) normalizzati per il gene housekeeping  $\beta$ -actina. Ogni ciclo corrisponde ad una quantità di mRNA dimezzata rispetto al valore del ciclo precedente.

L'oncoproteina MLL-AF9 della linea MOLM-13 risulta downregolata in seguito a trattamento con siRNA per MLL, mentre il trattamento con SCR non ha effetti di downregolazione aspecifici (**Figura 24**).

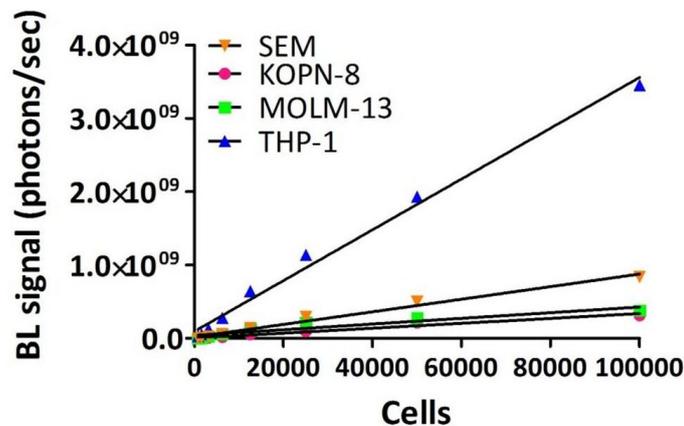
## 6. Clonaggio

Le cellule trasfettate stabilmente con il gene per la luciferasi di *Photinus pyralis* sono state analizzate per verificare l'efficienza di trasfezione e l'espressione di luciferasi (**Figura 26**).



**Figura 26.** Relazione tra numero di cellule (valutata con con trypan blue, Sigma) e intensità del segnale bioluminescente nelle diverse linee cellulari.

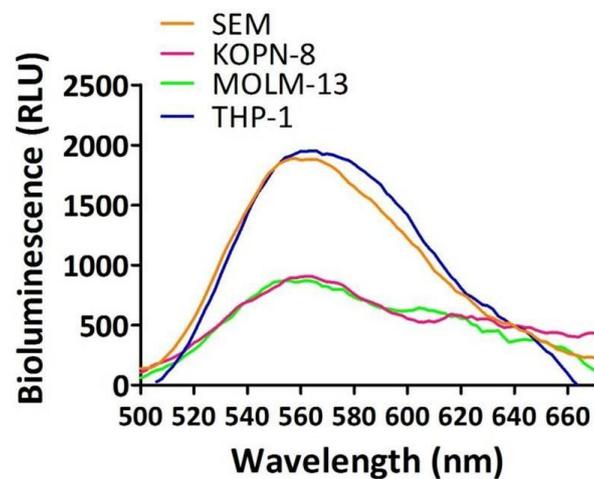
La relazione tra numero di cellule e intensità del segnale bioluminescente è stata confermata essere lineare (**Figura 27**). Il coefficiente di relazione è risultato essere superiore a 0,98 per ogni clone cellulare ( $p < 0.001$ ).



**Figura 27.** Analisi della regressione lineare tra numero di cellule e intensità del segnale bioluminescente nelle diverse linee cellulari.

Il segnale luminescente è risultato essere il più intenso per la linea THP-1-*luc*, seguita dalla linea SEM-*luc*; le linee cellulari KOPN-8-*luc* e MOLM-13-*luc* hanno mostrato una minore intensità di segnale bioluminescente.

E' stato analizzato lo spettro di emissione dei cloni per valutare che il segnale fosse specifico dell'attività della luciferasi, a 562 nm (**Figura 28**). L'intensità dello spettro di emissione ha mostrato lo stesso andamento del segnale luminescente, dove  $10^5$  cellule THP-1-*luc* e SEM-*luc* emettono circa  $2 \times 10^3$  RLU, mentre lo stesso numero di cellule MOLM-13-*luc* e KOPN-8-*luc* emettono leggermente meno di  $1 \times 10^3$  RLU.



**Figura 28.** Spettro di emissione della luciferasi a 562 nm nelle diverse linee cellulari.

La trasfezione del gene per la luciferasi non ha influenzato la crescita delle diverse linee cellulari.

## 7. Valutazione della bioluminescenza tramite siRNA

L'esperimento pilota in cui la linea cellulare THP-1-*luc* è stata trasfettata con siRNA Luc ha mostrato tramite analisi di bioluminescenza che il siRNA ha silenziato il gene per la luciferasi. Infatti, i valori di fotoni/secondo dei campioni trattati con siRNA Luc sono risultati nettamente inferiori rispetto ai campioni di controllo e trattati con siRNA SCR (**Figura 29**).

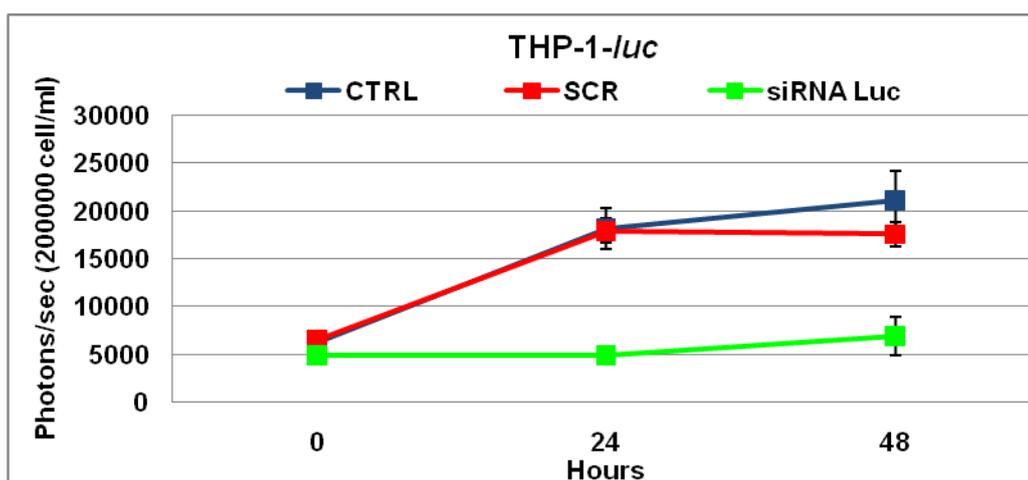


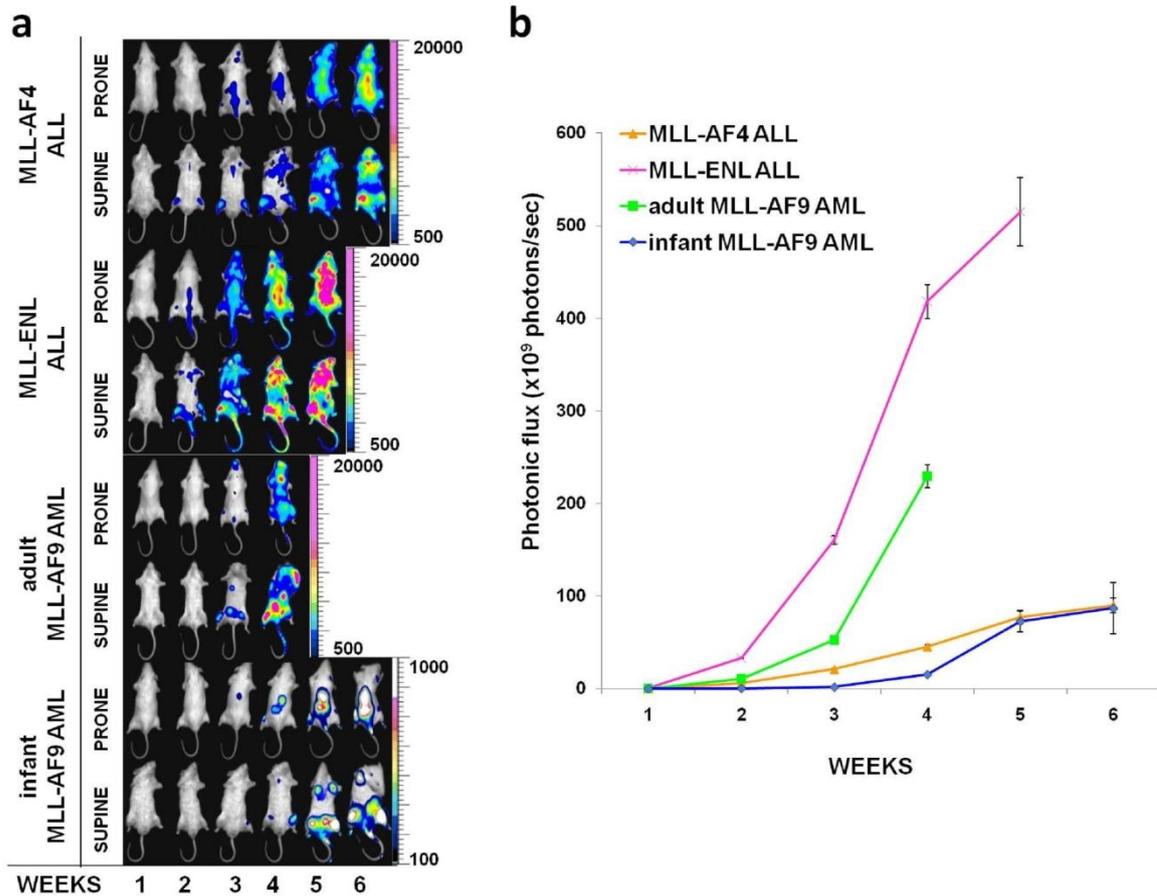
Figura 29. Analisi bioluminescente della linea cellulare THP-1-*luc* trasfettata con siRNA Luc.

In base a questi risultati si è constatato che il gene per la luciferasi non influenza in alcun modo le caratteristiche cellulari, e si è quindi proceduto con l'utilizzo delle linee cellulari ingegnerizzate con il gene per la luciferasi nei successivi esperimenti *in vivo*.

## 8. Sviluppo di modelli murini *xenograft* di leucemie acute

I risultati presentati in questa sessione sono stati sottoposti all'attenzione di importanti riviste scientifiche e sono attualmente sotto revisione <sup>[238]</sup>. Inoltre, data la loro rilevanza scientifica, sono stati scelti come comunicazione orale ed esposti al Simposio AISAL Imaging e Medicina Traslazionale tenutosi a Imola il 4-5 novembre 2010, e successivamente pubblicati sulla rivista scientifica *Comparative Medicine* <sup>[239,240]</sup>.

Tutti gli animali inoculati con cellule di leucemia ingegnerizzate con gene della luciferasi hanno sviluppato una leucemia, con incidenza quindi del 100%, come si è potuto valutare tramite BLI. I diversi modelli generati con le diverse leucemie hanno mostrato andamenti diversi della progressione tumorale. I risultati sono presentati come immagini con pseudocolori che rappresentano l'intensità del segnale luminescente sovrapposte a immagini fotografiche in scala di grigio (**Figura 30**).



**Figura 30.** (A) Immagini a pseudocolori dei modelli murini di leucemia. (B) Rappresentazione grafica del flusso di fotoni in fotoni al secondo.

Tre modelli, MLL-AF4, MLL-ENL e MLL-AF9 dell'adulto hanno sviluppato la leucemia a partire dal midollo osseo e successivamente hanno dato disseminazione tramite il circolo sanguigno ad organi periferici. Il modello MLL-AF9 infant ha mostrato generazione ed attecchimento della leucemia solo a livello del midollo osseo.

Le differenze tra i modelli sono state valutate in base a:

- periodo di latenza: definito come periodo dall'inoculo delle cellule nell'animale al momento in cui il segnale bioluminescente delle cellule leucemiche è diventato visibile;
- end-point: data di morte o sacrificio dell'animale.

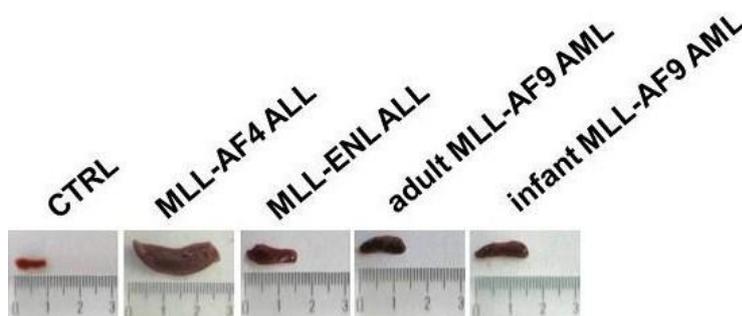
Il modello MLL-AF9 dell'adulto presenta un tempo di latenza di circa tre settimane ed un end-point di 4 settimane, il più breve tra i quattro modelli.

Il modello MLL-AF9 dell'adulto mostra diffuse metastasi solide a livello subcutaneo e osseo, con infiltrazioni anche a livello dei linfonodi; tali osservazioni sono state effettuate sia sui modelli ancora in vita, sia durante le autopsie.

Il modello MLL-AF9 infant ha il tempo di latenza più lungo tra i quattro modelli, in quanto la leucemia si sviluppa alla terza settimana, ed il segnale di bioluminescenza è il più basso tra i quattro modelli. Come introdotto sopra, il modello MLL-AF9 infant non ha mostrato disseminazione della leucemia al di fuori del midollo osseo ed il segnale luminoso è risultato confinato alle regioni di midollo osseo delle ossa degli arti e della spina dorsale. Inoltre, il bassissimo segnale bioluminescente indica anche un basso tasso di proliferazione cellulare.

Il modello MLL-ENL ha rivelato, come il modello MLL-AF9 dell'adulto, il più breve tempo di latenza ed un end-point di circa cinque settimane. Il segnale bioluminescente del modello MLL-ENL è risultato il più alto tra i quattro modelli, ed ha coperto tutto il corpo dell'animale, poiché la leucemia si è disseminata in tutto il corpo, sangue e organi. L'osservazione clinica e l'autopsia non hanno rivelato metastasi solide.

Il modello MLL-AF4 ha mostrato una latenza di due settimane e un end-point di sei. La leucemia MLL-AF4 ha dato importanti infiltrazioni a livello della milza, con evidente splenomegalia (**Figura 31**). La disseminazione è avvenuta fino al livello sottocutaneo, con evidente alopecia sulla testa e sul dorso degli animali (**Figura 32**).

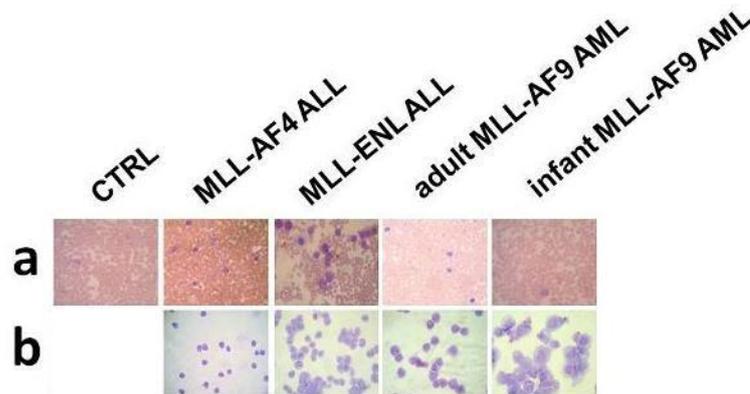


**Figura 31.** Milze dei topi trattati e di controllo.



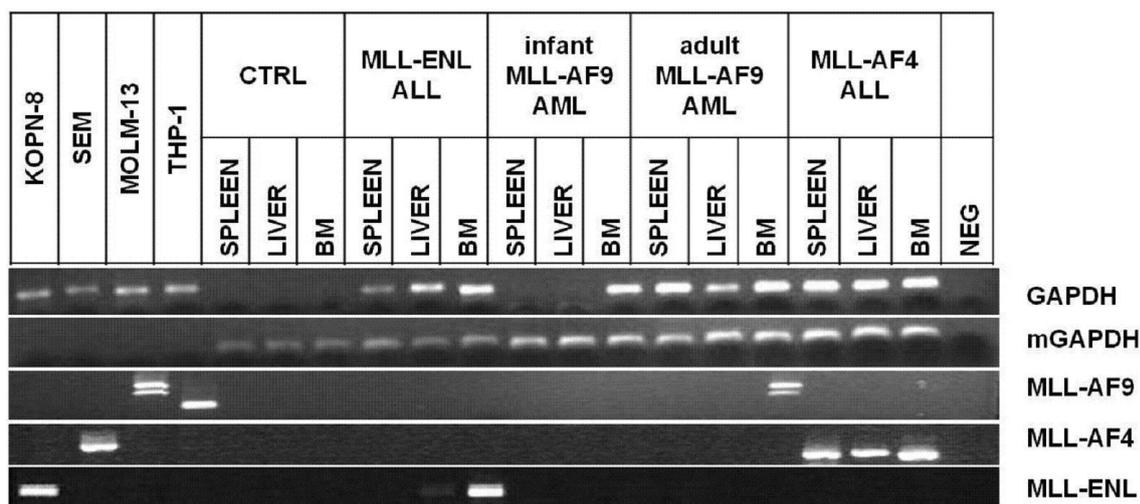
**Figura 32.** Topi inoculati con linea cellulare di leucemia acuta linfoblastica SEM-luc.

Il prelievo di sangue periferico, strisciato su vetrino e colorato con May-Grünwald-Giemsa, è stato confrontato con cellule di controllo e con prelievo da topo non inoculato con cellule leucemiche (**Figura 33**). I modelli MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-AF9 dell'adulto hanno rivelato infiltrazione del sangue periferico con cellule leucemiche, mentre il modello MLL-AF9 infant non ha mostrato cellule leucemiche nel sangue periferico, a conferma dei risultati di bioluminescenza.



**Figura 33.** (A) Colorazioni May-Grünwald-Giemsa di strisci di sangue periferico dei topi trattati. (B) Cellule di controllo utilizzate per la generazione dei modelli murini.

I tessuti prelevati a seguito di autopsia, milza, fegato e midollo osseo, sono stati analizzati tramite RT-PCR, e sono risultati positivi all'espressione degli oncogeni di fusione di MLL differenzialmente, confermando i risultati sia della bioluminescenza sia delle analisi cliniche (**Figura 34**).



**Figura 34.** Gel di agarosio dei geni analizzati sui tessuti dei topi trattati.

L'mRNA del gene housekeeping GAPDH umano è stato utilizzato come controllo; è risultato negativo nei campioni degli animali di controllo e positivo nelle linee cellulari e nei campioni degli animali inoculati con cellule leucemiche, eccetto per la milza ed il fegato del modello MLL-AF9 infant, confermando così l'infiltrazione della leucemia in tutto il corpo nei modelli MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-AF9 dell'adulto, e solo a livello del midollo osseo nel modello MLL-AF9 infant, come rilevato sia dalla bioluminescenza sia dalle analisi cliniche.

L'mRNA del gene housekeeping GAPDH murino è stato utilizzato per validare l'estrazione di RNA dai tessuti degli animali; è risultato positivo negli animali sia di controllo sia inoculati con cellule leucemiche, mentre è risultato negativo nelle linee cellulari, validando così la specificità.

L'mRNA dell'oncogene MLL-AF9 è risultato positivo solo nel midollo osseo del modello MLL-AF9 dell'adulto, mostrando le due isoforme caratteristiche della linea cellulare MOLM-13 <sup>[241]</sup>. Non è risultato positivo invece nei campioni MLL-AF9 infant, ma il risultato è in linea con i precedenti riguardo a MLL-AF9 infant.

L'mRNA dell'oncogene MLL-ENL è risultato chiaramente positivo nel midollo osseo dei modelli MLL-ENL, e molto meno evidente ma comunque presente nel fegato del modello stesso.

L'mRNA dell'oncogene MLL-AF4 è risultato positivo in tutti i campioni estratti dagli organi dei modelli MLL-AF4, confermando l'aggressività e l'infiltrazione della linea di leucemia acuta linfoblastica SEM-*luc* a livello periferico.

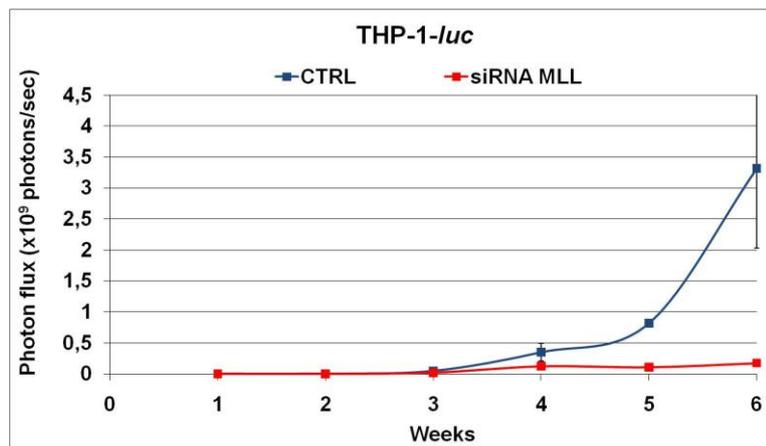
## 9. *Delivery in vivo*

I diversi sistemi di *delivery* di siRNA *in vivo* hanno dato differenti risultati ottenuti in base all'analisi della bioluminescenza dei modelli murini di leucemie acute trattati con siRNA.

### a) *Hydrodynamic injection*

La metodica di *hydrodynamic injection* è stata valutata su topi inoculati con linea cellulare THP-1-*luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9.

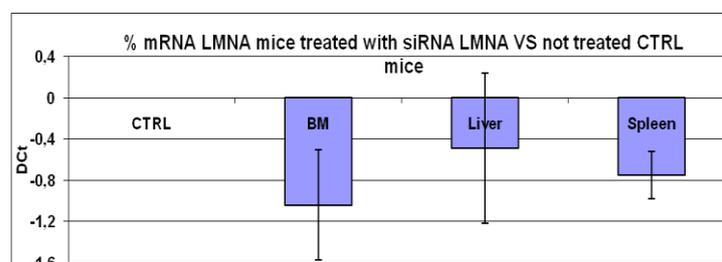
Il calo della bioluminescenza nei campioni trattati con siRNA MLL tramite *hydrodynamic injection* equivale a diminuzione della presenza di cellule leucemiche THP-1-*luc* (**Figura 35**).



**Figura 35.** Trattamento con siRNA tramite *hydrodynamic injection* di topi inoculati con linea cellulare THP-1-*luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9.

Questo risultato può essere attribuito all'efficienza del silenziamento dell'oncogene MLL-AF9 da parte del siRNA MLL iniettato tramite metodica *hydrodynamic injection*, che ha portato a morte cellulare delle linee cellulari leucemiche bersaglio.

Per quanto riguarda il trattamento con siRNA LMNA tramite metodica *hydrodynamic injection*, l'analisi molecolare mediante Real-Time PCR sull'mRNA LMNA di midollo osseo, fegato e milza dei modelli trattati, ha mostrato che il siRNA ha raggiunto e silenziato il bersaglio evidenziando un calo dell'mRNA dei modelli trattati rispetto ai controlli non trattati (**Figura 36**).



**Figura 36.** Analisi mRNA LMNA dopo trattamento con siRNA LMNA.

### b) PEI

La metodica trasfezione con PEI è stata valutata su topi inoculati rispettivamente con le linee cellulari *SEM-luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4, *KOPN-8-luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-ENL, *MOLM-13-luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9.

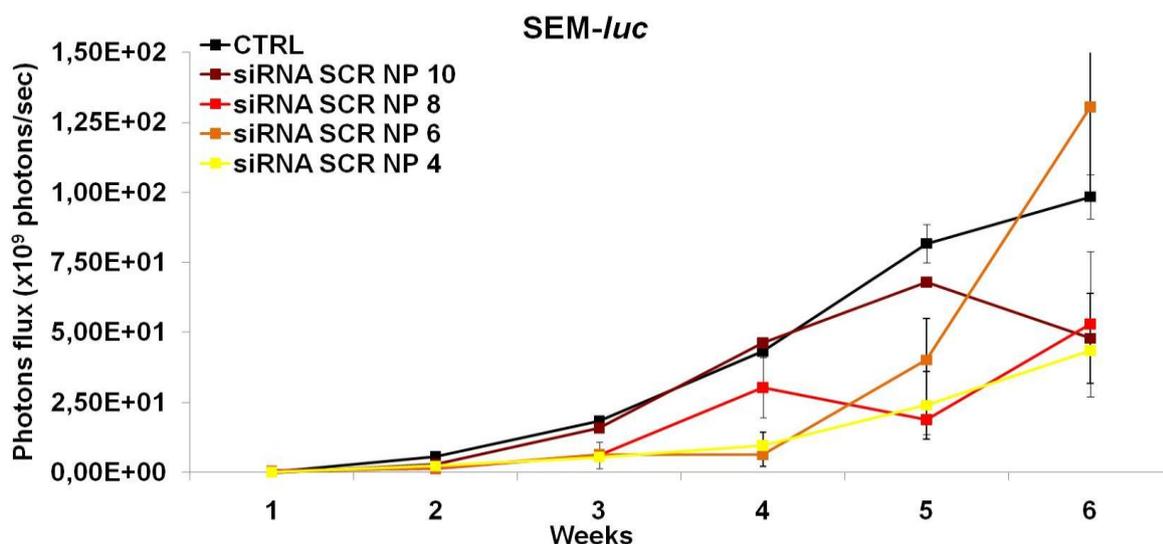
Per la linea cellulare *SEM-luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4 sono stati valutati i seguenti siRNA:

siRNA SCR in rapporto con JetPEI NP = 10, 8, 6, 4;

siRNA Luc in rapporto con JetPEI NP = 10, 8, 6;

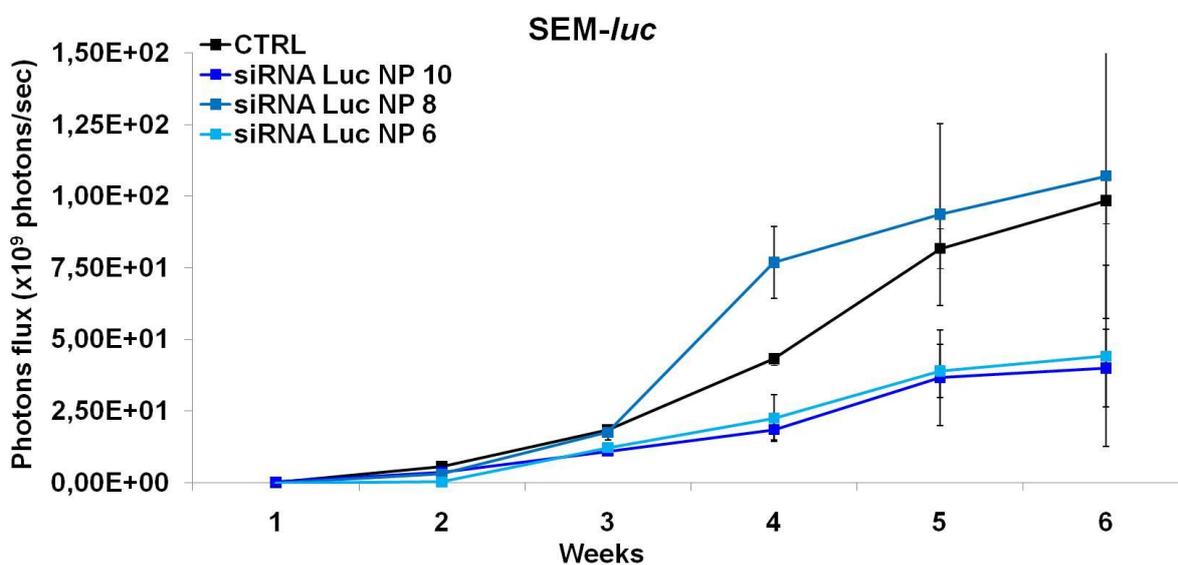
siRNA MLL in rapporto con JetPEI NP = 10, 6, 4.

I risultati del trattamento con siRNA SCR hanno mostrato che il siRNA SCR NP 10 non causa calo del segnale bioluminescente nei modelli trattati e si mantiene al livello dei valori del controllo tranne al momento dell'ultima acquisizione prima dell'end-point. Si ha invece diminuzione del segnale bioluminescente nei modelli trattati con siRNA SCR NP 8, 6, 4 (**Figura 37**).



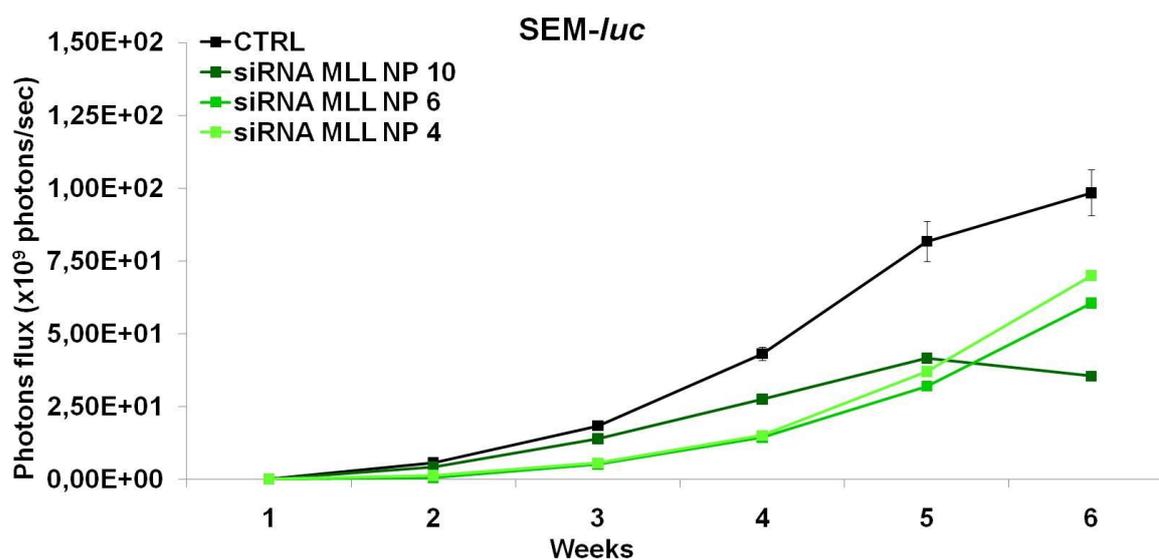
**Figura 37.** Trattamento con siRNA SCR tramite JetPEI di topi inoculati con linea cellulare SEM-luc di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4.

I risultati del trattamento con siRNA Luc hanno mostrato che i siRNA Luc NP 10 e 6 causano calo del segnale bioluminescente nei modelli trattati, come ci si aspettava in seguito ad inibizione del gene per la luciferasi da parte del siRNA Luc. Per i modelli trattati con siRNA Luc 8, invece, si ha un andamento del segnale bioluminescente che si mantiene ai livelli del segnale dei modelli di controllo (**Figura 38**).



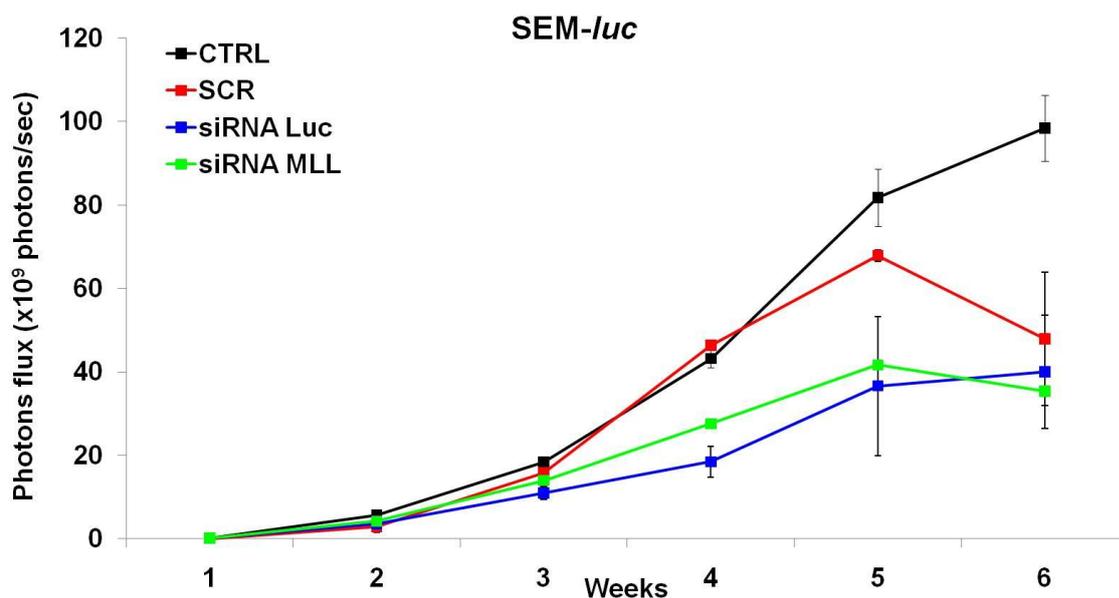
**Figura 38.** Trattamento con siRNA Luc tramite JetPEI di topi inoculati con linea cellulare SEM-*luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4.

I risultati del trattamento con siRNA MLL hanno mostrato che tutte le combinazioni utilizzate hanno portato a calo del segnale bioluminescente nei modelli trattati, come ci si aspettava in seguito ad inibizione dell'oncogene di fusione MLL da parte del siRNA MLL (**Figura 39**).



**Figura 39.** Trattamento con siRNA MLL tramite JetPEI di topi inoculati con linea cellulare SEM-*luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4.

I risultati ottimali in termini di rapporti NP sono stati dati dai rapporti NP = 10 (**Figura 40**).



**Figura 40.** Trattamento con siRNA NP = 10 tramite JetPEI di topi inoculati con linea cellulare SEM-luc di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-AF4.

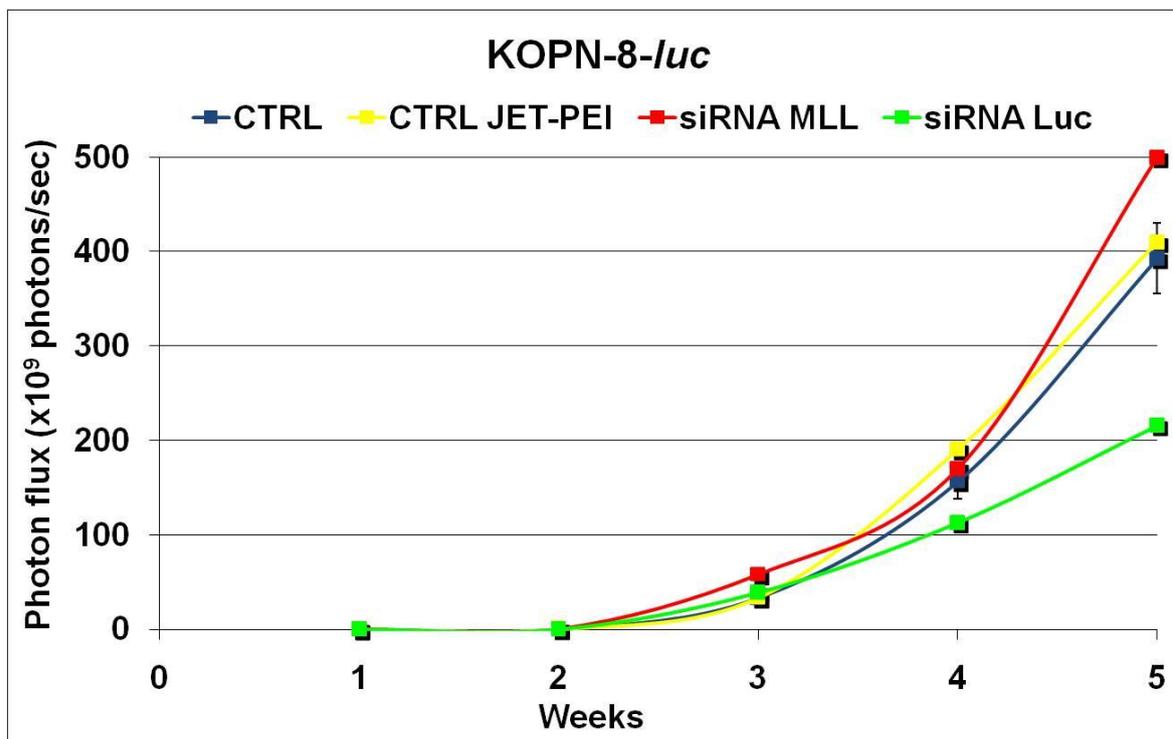
Per la linea cellulare KOPN-8-luc di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-ENL sono stati valutati i seguenti siRNA:

siRNA Luc in rapporto con JetPEI NP = 10;

siRNA MLL in rapporto con JetPEI NP = 10;

reagente JetPEI scarico (senza siRNA) come controllo di tossicità.

I risultati del trattamento con siRNA Luc hanno evidenziato calo del segnale bioluminescente nei modelli trattati, come ci si aspettava in seguito ad inibizione del gene per la luciferasi da parte del siRNA Luc. I modelli trattati con reagente scarico hanno mantenuto valori paragonabili a quelli dei controlli non trattati, risultando quindi in una assenza di tossicità aspecifica del reagente verso le cellule. I modelli trattato con siRNA MLL non hanno dato risultati attesi, in quanto non mostrano diminuzione del segnale bioluminescente (**Figura 41**).



**Figura 41.** Trattamento con siRNA tramite JetPEI di topi inoculati con linea cellulare KOPN-8-*luc* di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione MLL-ENL.

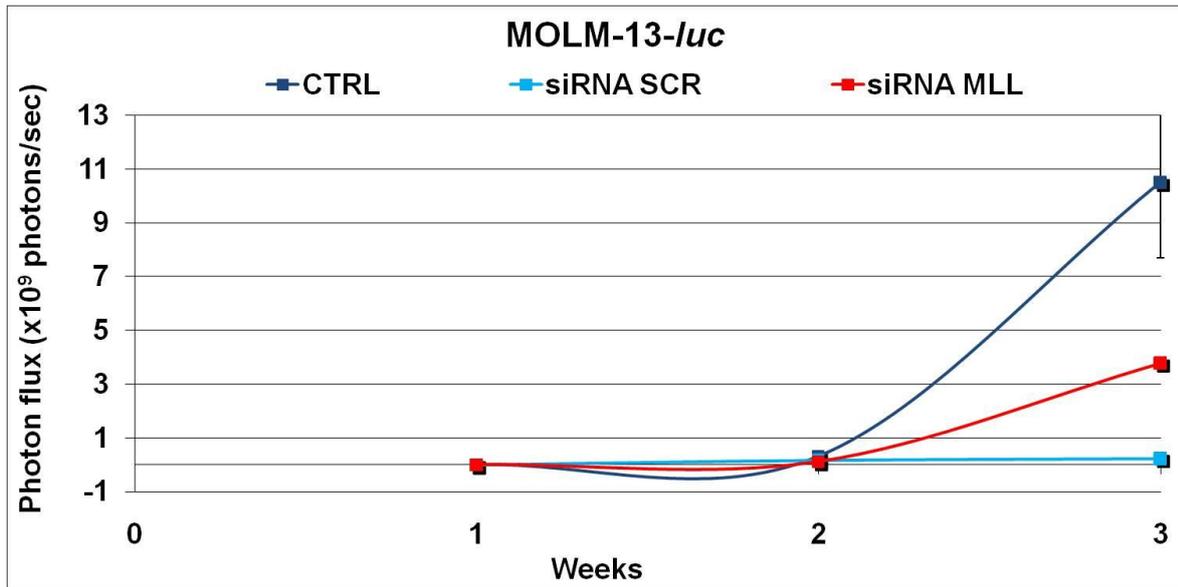
Per la linea cellulare MOLM-13-*luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9 sono stati valutati i seguenti siRNA:

siRNA SCR in rapporto con JetPEI NP = 10;

siRNA MLL in rapporto con JetPEI NP = 10;

reagente JetPEI scarico (senza siRNA) come controllo di tossicità.

I risultati del trattamento con siRNA MLL hanno evidenziato calo del segnale bioluminescente nei modelli trattati, come ci si aspettava in seguito ad inibizione dell'oncogene di fusione MLL da parte del siRNA MLL. I modelli trattati con siRNA SCR, invece, non hanno dato risultati attesi, in quanto mostrano diminuzione del segnale bioluminescente invece che rimanere ai livelli del controllo non trattato (**Figura 42**).



**Figura 42.** Trattamento con siRNA tramite JetPEI di topi inoculati con linea cellulare MOLM-13-*luc* di leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9.

## DISCUSSIONE

I riarrangiamenti del gene MLL, localizzato alla banda cromosomica 11q23, sono coinvolti con lo sviluppo di leucemie acute con fenotipo mieloide, linfoide, immaturo, o bifenotipico, sia in età pediatrica che adulta [19,29]. Le leucemie che presentano riarrangiamenti del gene MLL, mostrano una particolare aggressività, sono associati allo sviluppo di leucemia acuta ad alto rischio (iperleucocitosi e coinvolgimento extramidollare) e sono scarsamente responsive alle terapie convenzionali; inoltre, i pazienti leucemici con riarrangiamenti del gene MLL presentano recidive più frequenti ed una durata di remissione più breve rispetto ai pazienti leucemici che non presentano tali riarrangiamenti del gene MLL [75,76]. Sono attualmente noti più di 50 geni partner, che rendono le leucemie acute con traslocazione di MLL un'apatologia complessa ed eterogenea con sottogruppi di differente aggressività e prognosi a seconda dell'oncogene di fusione che generano.

In questo studio sono stati presi in considerazione diversi riarrangiamenti di MLL e sono stati usati come bersaglio di terapia molecolare basata sul fenomeno del silenziamento genico mediato da siRNA.

Per progettare gli esperimenti sono stati presi in considerazione lavori già avviati nel Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli" del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna. In particolare, era stato precedentemente pubblicato uno studio per indagare il ruolo dell'oncogene di fusione MLL-AF9 nella linea cellulare di leucemia pediatrica THP-1 [242]. Le cellule THP-1, isolate dal sangue periferico di un bambino di 1 anno affetto da leucemia monocitica [243], possiedono la traslocazione t(9;11)(p22;q23) ed esprimono in modo costitutivo l'oncogene di fusione MLL-AF9 [244]. Per effettuare studi di funzione dell'oncogene MLL-AF9, nel Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica è stato sintetizzato un oligonucleotide

fosforotioato antisense (PS-ODNas), diretto verso il *breakpoint* dell'mRNA di MLL-AF9 <sup>[242]</sup>. I risultati hanno dimostrato che l'inibizione selettiva del trascritto MLL-AF9, mediante PS-ODNas, provoca una notevole riduzione della proliferazione delle cellule THP-1 ed un aumento dell'apoptosi; inoltre, è stato rilevato anche un aumento di cellule nella fase G2/M del ciclo cellulare. Anche altri studi di letteratura confermano l'inibizione della proliferazione cellulare e l'induzione di apoptosi in seguito a trattamenti con oligonucleotidi antisense contro gli oncogeni di fusione di MLL <sup>[245-248]</sup>.

In questo lavoro si è voluta approfondire la metodica del silenziamento genico degli oncogeni di fusione di MLL utilizzando, siRNA al posto degli oligonucleotidi antisense, in quanto la struttura a doppio filamento li rende più resistenti alla degradazione da parte di nucleasi, ed il sistema di silenziamento tramite il complesso RISC risulta più specifico <sup>[249]</sup>.

## 1. Analisi bioinformatica

Sono stati disegnati tramite analisi bioinformatica siRNA specifici per la porzione conservata del gene MLL che si ritrova in tutte le traslocazioni di MLL, per la regione di *breakpoint* specifica di ogni riarrangiamento e per la porzione del gene partner. Il *design* di siRNA efficienti è risultato un passaggio di cruciale importanza in quanto diversi fattori influenzano un corretto appaiamento del siRNA con il bersaglio: la sequenza, il ripiegamento dell'mRNA, la stabilità termodinamica <sup>[102-105]</sup>.

Sono stati disegnati 20 siRNA sulla regione conservata di MLL (**Figura 18a**), tutti rispondenti ai criteri di Tuschl *et al.* <sup>[176]</sup> e Reynold *et al.* <sup>[177]</sup>, ma l'efficienza del silenziamento in seguito ad analisi di Real-Time PCR è risultata molto diversa tra i siRNA.

Dei 20 siRNA disegnati su MLL e valutati sulla linea cellulare THP-1, 5 hanno indotto un silenziamento del gene MLL-AF9 di più del 50%, e di questi 3 superiore al 70% (siMLL6, siMLL15, siMLL20). Tutti e 3 questi siRNA risultano cadere, in base ad analisi del ripiegamento dell'mRNA effettuate con i programmi sFOLD <sup>[188]</sup> e mFOLD <sup>[189]</sup>, in regioni dell'mRNA bersaglio con conformazione a loop, cioè a singolo filamento.

Questo risultato può indicare una preferenza del sistema di silenziamento per regioni dell'mRNA bersaglio a filamento singolo, per avere una maggiore facilità di riconoscimento da parte del siRNA verso una sequenza di mRNA bersaglio a singolo filamento e senza strutture secondarie, un più facile appaiamento ed un minore ingombro sterico degli enzimi dei complessi di silenziamento.

## 2. Analisi cellulari molecolari e di proliferazione

In seguito alle analisi sulla linea cellulare THP-1, sulla quale è stata validata l'efficienza di silenziamento dell'oncogene MLL-AF9 dei siRNA disegnati, sono state scelte altre linee cellulari derivate da pazienti con leucemia acuta sia mieloide che linfoblastica che bifenotipica con traslocazioni di MLL per valutare l'efficienza dei siRNA migliori.

Come la linea cellulare THP-1, anche le linee MOLM-13, MM6 e NOMO-1 contengono la traslocazione t(9;11)(p22;q23) con formazione dell'oncogene di fusione MLL-AF9, ma presentano diverse caratteristiche morfologiche che le rendono diversamente suscettibili all'azione di farmaci, e, nel nostro caso, dei siRNA.

La linea cellulare MOLM-13 è stata stabilizzata dal sangue periferico di un paziente di 20 anni con ricaduta di leucemia acuta monocitica, sottotipo M5a, che è evoluta in sindrome mielodisplastica <sup>[250]</sup>. L'analisi dell'immunofenotipo della linea MOLM-13 rivela diversi antigeni mielomonocitici, mentre la morfologia risulta monoblastoide, nuclei rotondi e lobulati con cromatina fine e nucleoli prominenti, e citoplasma leggermente basofilo <sup>[250]</sup>. La linea MOLM-13 ha risposto positivamente al trattamento con siRNA contro l'oncogene di fusione MLL-AF9, sia per quanto riguarda il silenziamento dell'espressione genica, sia per quanto riguarda la diminuzione della proliferazione cellulare (**Figura 21**). Anche il gene *MLL<sub>wt</sub>* è risultato downregolato in maniera aspecifica, ma comunque in misura minore rispetto a MLL-AF9 (**Figura 22**). È inoltre la linea cellulare di leucemia acuta mieloide che ha dato i risultati migliori in termini di calo della proliferazione cellulare (**Figura 19**).

La linea cellulare MM6 è stata stabilizzata dal sangue periferico di un paziente di 64 anni con ricaduta di leucemia acuta monocitica M5 seguita da metaplasia mieloide <sup>[251,252]</sup>. La linea MM6 mostra caratteristiche fenotipiche e funzionali dei monociti, attualmente rappresenta l'unica linea monocitica matura disponibile, per cui è un ottimo strumento di studio <sup>[253]</sup>. La linea MM6 ha risposto positivamente al trattamento del siRNA contro l'oncogene di fusione MLL-AF9 per quanto riguarda il silenziamento dell'espressione genica (**Figura 21**). Anche il gene *MLL<sub>wt</sub>* è risultato downregolato in maniera aspecifica, ma comunque in misura minore rispetto a MLL-AF9 (**Figura 22**). La linea MM6 ha però dimostrato resistenza all'inibizione della proliferazione cellulare (**Figura 19**); questo può essere dovuto al fatto che è una linea derivata da un paziente adulto, per cui probabilmente con l'avanzare dell'età si sono accumulate ulteriori mutazioni che hanno reso la linea più resistente non solo a causa della traslocazione MLL-AF9 ma anche di altre traslocazioni e quindi probabilmente l'inibizione di MLL-AF9 non è sufficiente a indurre anche diminuzione della proliferazione cellulare.

La linea cellulare NOMO-1 è stata stabilizzata dal sangue midollare di una paziente di 31 anni con leucemia acuta mieloide M5a alla seconda ricaduta; mostra forte attività lisozimica, fagocitica e risponde all'induzione del differenziamento con TPA <sup>[254]</sup>. La linea NOMO-1 ha risposto positivamente al trattamento del siRNA contro l'oncogene di fusione MLL-AF9 per quanto riguarda il silenziamento dell'espressione genica, mentre ha dimostrato resistenza all'inibizione della proliferazione cellulare, probabilmente per gli stessi motivi descritti per la linea MM6 (**Figure 21, 22, 19**).

La linea cellulare ML-2 con traslocazione t(6;11)(q27;q23) MLL-AF6 è stata stabilizzata dal sangue periferico di un paziente di 26 anni con linfoma a

cellule T che, dopo remissione, ha portato allo sviluppo di leucemia acuta mieloide M4 <sup>[255-257]</sup>. La linea ML-2 non ha risposto positivamente al trattamento con siRNA contro l'oncogene MLL-AF6 (**Figure 21, 19**). L'inibizione dell'espressione genica è stata di circa il 30-40%, mentre l'inibizione della crescita è risultata di circa il 40% rispetto al controllo, ma è paragonabile ai campioni trattati con siRNA SCR, per cui è plausibile che l'inibizione della crescita sia dovuta a fattori aspecifici. Paradossalmente, l'inibizione aspecifica del gene *MLL<sub>wt</sub>* è risultata maggiore rispetto a quella dell'oncogene MLL-AF6 (**Figura 22**). Inoltre, la traslocazione t(6;11)(q27;q23) MLL-AF6 porta ad una tra le leucemie acute mieloidi con traslocazione di MLL più aggressive e a peggior prognosi, per cui è probabile che siano coinvolte altre mutazioni o alterazioni molecolari o cellulari che rendono la cellula con traslocazione t(6;11)(q27;q23) MLL-AF6 più aggressiva e resistente. E' quindi probabilmente necessario un trattamento combinato rivolto non solo all'oncogene MLL-AF6 ma anche ad ulteriori bersagli di cui è necessario studiare le caratteristiche.

Le linee di leucemia acuta linfoblastica SEM, RS4;11, KOPN-8 e KARPAS-45 presentano tutte caratteristiche immunofenotipiche e morfologiche in comune con le leucemie acute mieloidi, per cui vengono considerate anche leucemie acute bifenotipiche.

La linea cellulare SEM con traslocazione t(4;11), è stata stabilizzata dal sangue periferico di una bambina di 5 anni con ricaduta di leucemia acuta linfoblastica <sup>[258]</sup>. La linea SEM esprime sia gli antigeni di lineage B CD19, CD22 e CDw75, sia gli antigeni mieloidi CD13, CD15, CD33 e CDw65, confermando le caratteristiche bifenotipiche <sup>[259]</sup>. La linea SEM ha risposto positivamente al trattamento con siRNA contro l'oncogene di fusione MLL-AF4, sia per quanto riguarda il silenziamento dell'espressione genica, sia per

quanto riguarda la diminuzione della proliferazione cellulare (**Figure 21, 20**). Inoltre, il trattamento non ha inficiato quasi per nulla (solo un 20% circa) sul gene *MLL<sub>wt</sub>* (**Figura 22**). E' inoltre la linea cellulare di leucemia acuta linfoblastica che ha dato i risultati migliori in termini di calo della proliferazione cellulare (**Figura 20**).

La linea cellulare RS4;11 è stata la prima linea stabilizzata con traslocazione t(4;11); è stata stabilizzata dal midollo osseo ottenuto da una paziente di 32 anni alla prima ricaduta di leucemia acuta linfoblastica con traslocazione t(4;11) <sup>[260]</sup>. La linea RS4;11 mostra caratteristiche morfologiche, immunologiche e citochimiche tipiche delle leucemie acute linfoblastiche, ma un'analisi più approfondita rivela caratteristiche sia linfoblastiche sia mieloidi. La linea RS4;11 ha risposto positivamente al trattamento con siRNA contro l'oncogene di fusione MLL-AF4 per quanto riguarda il silenziamento dell'espressione genica, e non ha dato alcun effetto di inibizione aspecifica del gene *MLL<sub>wt</sub>* (**Figure 21, 22**). L'effetto di inibizione della proliferazione cellulare ha cominciato ad essere evidente negli ultimi giorni del protocollo di trattamento, implicando probabilmente il coinvolgimento di ulteriori meccanismi di blocco della crescita cellulare oltre agli effetti dell'inibizione dell'oncogene MLL-AF4 (**Figura 20**).

La linea cellulare KOPN-8 con traslocazione t(11;19)(q23;p13.3) che porta alla formazione dell'oncogene di fusione MLL-ENL <sup>[34]</sup>, è stata stabilizzata dal sangue periferico di una bambina di 3 mesi con leucemia acuta linfoblastica pre-B (BCP-ALL) di tipo B-III <sup>[261,262]</sup>. La linea KOPN-8 ha risposto positivamente al trattamento con siRNA contro l'oncogene di fusione MLL-ENL per quanto riguarda il silenziamento dell'espressione genica ed ha dato bassissimi livelli di effetti di inibizione aspecifica a carico del gene *MLL<sub>wt</sub>* (**Figure 21, 22**). L'effetto di inibizione della proliferazione cellulare

ha cominciato ad essere evidente negli ultimi giorni del protocollo di trattamento, implicando probabilmente il coinvolgimento di ulteriori meccanismi di blocco della crescita cellulare oltre agli effetti dell'inibizione dell'oncogene MLL-ENL (**Figura 20**).

La linea cellulare KARPAS-45 con traslocazione t(X;11) MLL-AFX è stata stabilizzata dal sangue midollare di un paziente di 2 anni con leucemia acuta linfoblastica a cellule T <sup>[263]</sup>; la linea KARPAS-45 porta anche la traslocazione reciproca AFX-MLL. La linea KARPAS-45 ha risposto positivamente al trattamento con siRNA contro l'oncogene di fusione MLL-AFX per quanto riguarda il silenziamento dell'espressione genica, con qualche effetto di inibizione aspecifica del gene MLL<sub>wt</sub> (**Figure 21, 22**). L'effetto di inibizione della proliferazione cellulare ha cominciato ad essere evidente negli ultimi giorni del protocollo di trattamento, implicando probabilmente il coinvolgimento di ulteriori meccanismi di blocco della crescita cellulare oltre agli effetti dell'inibizione dell'oncogene MLL-AFX (**Figura 20**).

Per quanto riguarda l'espressione genica dei geni sotto il controllo di MLL, è noto che, in condizioni fisiologiche, i geni HOXA e MEIS sono upregolati da MLL, che ne influenza il mantenimento durante lo sviluppo embrionale con lo scopo di regolare la segmentazione corporea e l'attivazione della differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche, dei progenitori mieloidi e linfoidi nei lineage specifici <sup>[29-32]</sup>. L'espressione dei geni HOXA e MEIS1 è molto alta in cellule mieloidi indifferenziate e proliferanti, mentre è down-regolata quando tali cellule differenziano terminalmente <sup>[26,36]</sup>.

Il meccanismo di normale proliferazione cellulare mieloidi può essere alterato dall'espressione di oncogeni come MLL-AF9. Infatti, l'espressione di MLL-AF9 induce, sia in normali progenitori mieloidi murini che aviani, una

up-regolazione dei geni HOXA e di MEIS1, e una conseguente una iperproliferazione cellulare [29,36-38,83,264,265]. È stato anche dimostrato che la down-regolazione selettiva di MLL-AF9 con un PS-ODNas in cellule THP-1 riduce l'espressione dei geni HOXA7 ed HOXA10 [245]. Inoltre, le leucemie umane con t(9;11)(q21;q23) presentano spesso iperleucocitosi alla diagnosi [19] e geni come HOXA e MEIS1 sono spesso iperespressi in molte LAM con o senza t(9;11)(q21;q23) [266-270].

Per validare tali risultati, in questo lavoro è stata valutata l'espressione dei geni HOXA7, HOXA9, HOXA10 e MEIS1 in cellule con traslocazione di MLL in seguito a trattamento con siRNA contro gli oncogeni di fusione di MLL (**Figura 23**).

In seguito a downregolazione delle forme traslocate di MLL con siRNA, i geni HOXA e MEIS risultano ritornare downregolati in tutte le linee cellulari, come atteso, con eccezione della linea cellulare ML-2 con traslocazione MLL-AF6 e della linea cellulare KARPAS-45 con traslocazione MLL-AFX.

Per quanto riguarda la linea cellulare MLL-AF6, è già stata mostrata la resistenza al trattamento con siRNA, per cui si può ipotizzare che anche l'andamento dei geni sotto il controllo di MLL sia influenzato da un non efficace esito del trattamento. Inoltre, si ricordano le caratteristiche di grande aggressività e prognosi estremamente sfavorevole della leucemia mieloide acuta con traslocazione MLL-AF6 [76].

La linea cellulare KARPAS-45 riporta andamenti diversi dalle altre linee di leucemia mieloide con traslocazioni di MLL per quanto riguarda l'espressione dei geni sotto il controllo di MLL. Questo può essere dovuto anche alle difficoltà di coltura della linea KARPAS-45, di cui si hanno pochi campioni stoccati in tutto il mondo, per la difficoltà di espansione. Tali considerazioni sono state prese in seguito agli esperimenti effettuati ed alla comunicazione con i pochi altri ricercatori che possiedono ed utilizzano tale

linea cellulare. Sono comunque da approfondire tali divergenze. E' quindi probabilmente necessario allestire un'altra linea cellulare con traslocazione MLL-AFX per studi *in vitro*.

E' stata inoltre valutata l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nel differenziamento, nell'apoptosi, nella trasduzione del segnale, per capire se la trasformazione neoplastica coinvolge anche altri pathway oltre ai meccanismi di regolazione genica sotto il controllo di MLL. Inoltre, è stato di recente affermato che un preciso profilo di espressione genica è predittivo dei diversi sottotipi di leucemie mieloidi acute pediatriche e può sostituire i diversi test diagnostici nel 40% dei casi di LAM <sup>[271]</sup>. Tale possibilità apre anche le strade a nuove terapie mirate che possono essere iniziate precocemente grazie a tale diagnosi.

Anche in questo lavoro è stata approfondita l'espressione di geni coinvolti nella trasformazione e progressione neoplastica per valutare una possibile correlazione con la prognosi e quindi una precoce diagnosi e conseguente terapia.

Il gene FKHR, o FOXO1 (forkhead box O1), appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione forkhead, caratterizzati da un tipico dominio forkhead, che normalmente regolano geni coinvolti nell'apoptosi e nel ciclo cellulare, con ruolo di oncosoppressori. Il gene FKHR presenta omologie sia con il gene AFX, sia con il gene AF6 <sup>[92,93,96]</sup>. La traslocazione t(2;13)(q35;q14) PAX3-FKHR è associata a rhabdomyosarcoma alveolare ed è stata ipotizzata un'analogia tra la traslocazione MLL-AFX e la traslocazione PAX3-FKHR, per la presenza di un dominio forkhead nelle regioni conservate di AFX e FKHR e per le posizioni aminoacidiche delle traslocazioni, che portano entrambe ad un'aumentata azione di attivazione trascrizionale da parte di entrambe le oncoproteine di fusione <sup>[92]</sup>. Il gene FKHR è risultato

downregolato dal trattamento con siRNA in tutte le linee cellulari tranne MOLM-13 con traslocazione MLL-AF9. In letteratura le conoscenze riguardo a FKHR sono contrastanti. Come fattore di trascrizione coinvolto nell'apoptosi e nel ciclo cellulare, FKHR sembra necessario in associazione ad agenti terapeutici antitumorali per favorire la risposta agli stessi e indurre blocco della proliferazione cellulare tumorale <sup>[273,274]</sup>. Altri studi invece vedono FKHR coinvolto nella patogenesi della sarcopenia, una patologia legata a declino della massa muscolare legata all'invecchiamento e direttamente associata a obesità e diabete <sup>[275]</sup>. E' quindi necessario approfondire l'attività di oncosoppressore del gene FKHR ed il suo coinvolgimento nel pathway di MLL, per capire se la downregolazione di FKHR in seguito a downregolazione degli oncogeni di fusione di MLL con siRNA porta ad un vantaggio nel blocco della proliferazione cellulare tumorale.

Il gene p21, o CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), codifica per un potente inibitore delle chinasi ciclina-dipendente, e agisce come regolatore del ciclo cellulare nella progressione alla fase G1. Studi precedenti hanno dimostrato che la upregolazione di p21 da parte di inibitori epigenetici di MLL porta ad un arresto del ciclo cellulare <sup>[276]</sup>. Inoltre, tra la proteina MLL e la proteina p21 si trova la proteina p53, in quanto si è visto che le oncoproteine di fusione di MLL, ma non MLL *wild type*, inibiscono l'attività trascrizionale di p53, che a sua volta induce l'espressione di p21 e quindi l'apoptosi <sup>[277,278]</sup>. In questo lavoro il gene p21 è risultato downregolato nelle linee di leucemia acuta linfoblastica o bifenotipica trattate con siRNA verso MLL, mentre risulta diversamente regolato nelle linee di leucemia acuta mieloide. E quindi necessario uno studio più mirato alle relazioni che coinvolgono anche p53 nei meccanismi tra MLL e p21.

Il gene FLT3 (FMS-related tyrosine kinase-3) è un recettore tyrosine kinase espresso in progenitori emopoietici e gioca un ruolo importante nello sviluppo emopoietico. FLT3 si trova mutato in blasti di pazienti con leucemia mieloide acuta, ed è inoltre overespresso in pazienti con leucemia linfoblastica acuta con riarrangiamenti di MLL <sup>[228,279-281]</sup>. Il trattamento con siRNA contro MLL ha portato alla downregolazione di FLT3 nelle linee di leucemia acuta mieloide MOLM-13 e NOMO-1 con traslocazione MLL-AF9, e nella linea di leucemia acuta linfoblastica KOPN-8 con traslocazione MLL-ENL, mentre nelle altre linee ha portato ad overespressione di FLT3. Per quanto riguarda le linee di leucemia acuta linfoblastica, l'inibizione di MLL-ENL con la conseguente inibizione dell'overespressione di FLT3 porta il vantaggio di colpire con un'unica terapia, come quella del siRNA contro MLL, due bersagli molecolari implicati entrambi nella progressione delle leucemie acute linfoblastiche con traslocazione MLL-ENL. In base ai risultati, questo non si può dire per le leucemie acute linfoblastiche con traslocazione MLL-AF4 e MLL-AFX, in cui sembra addirittura che FLT3 aumenti la sua espressione. E' necessario quindi un ulteriore approfondimento sulla relazione tra MLL, FLT3 e le leucemie acute linfoblastiche.

Il gene FLT3LG (FMS-related tyrosine kinase-3 ligand) codifica per il ligando di FLT3 ed appartiene alla classe dei fattori di crescita emopoietici. Viene espresso da cellule leucemiche appartenenti a tutti i diversi lineage emopoietici, e stimola la proliferazione delle cellule leucemiche <sup>[281]</sup>. In seguito a trattamento con siRNA contro MLL, la maggior parte delle linee cellulari trattate ha risposto con downregolazione dell'espressione di FLT3LG, colpendo anche in questo caso due bersagli terapeutici con un unico trattamento.

Il gene LMO2 (LIM domain only 2 rhombotin-like 1) codifica per una proteina ricca in cisteine con due domini LIM, richiesta per l'eritropoiesi a livello del sacco vitellino, ha un ruolo centrale e cruciale nello sviluppo emopoietico ed è altamente conservata. LMO2 è considerato un oncogene e si trova overespresso in leucemie acute con traslocazione MLL <sup>[281,282]</sup>. Il trattamento con siRNA contro MLL ha portato a diverse risposte da parte delle diverse linee cellulari di leucemia acuta, implicando ulteriori approfondimenti della relazione tra MLL e LMO2.

Il gene MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog avian) codifica per una proteina multifunzionale che agisce a livello nucleare come regolatrice del ciclo cellulare, dell'apoptosi e della trasformazione cellulare. MYC funziona come un fattore di trascrizione che regola la trascrizione di specifici geni target. Mutazioni, riarrangiamenti, overespressioni e traslocazioni sono associate con un'enorme varietà di tumori solidi e del sangue dell'età pediatrica <sup>[283,284]</sup>. Diversi lavori con lo scopo di generare terapie mirate di nuova generazione come oligonucleotidi antisenso che hanno come bersaglio terapeutico l'oncogene MYC vengono portati avanti nel laboratorio di Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli" del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna <sup>[285,286]</sup>. Inoltre, MYC si trova attivato in leucemie acute linfoblastiche con traslocazioni di MLL <sup>[287]</sup>. In questo studio, in seguito a trattamento con siRNA contro MLL, la maggior parte delle linee cellulari trattate ha risposto anche con downregolazione dell'espressione di MLL, portando al vantaggio di colpire con un unico trattamento, come quella del siRNA contro MLL, due bersagli terapeutici. con molecolari implicati entrambi nella progressione delle leucemie acute.

Il gene CD44 è il principale recettore di membrana dell'acido ialuronico, ed è indispensabile per le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice

extracellulare. E' espresso soprattutto da leucociti e fibroblasti. In diversi tumori è stato visto che CD44 subisce tagli proteolitici che producono una porzione solubile coinvolta nella migrazione cellulare, ed una porzione intracellulare che trasloca nel nucleo e promuove la trascrizione di diversi geni tra cui il suo stesso <sup>[288]</sup>. I tumori sono inoltre ricchi del ligando di CD44, l'acido ialuronico, che promuove l'azione invasiva del tumore ed è associato a prognosi negativa. La proteina CD44 conferisce resistenza ai farmaci e si trova upregolato in leucemie acute linfoblastiche con traslocazione MLL <sup>[288]</sup>. In questo lavoro, tutte le linee cellulari trattate con siRNA contro MLL, con lieve eccezione di NOMO-1 con traslocazione MLL-AF9, hanno risposto uniformemente con overespressione di CD44.

Il gene FHIT (fragile histidine triad gene) è un oncosoppressore che risulta inattivato nelle leucemie acute mieloidi e linfoblastiche con traslocazione MLL <sup>[289]</sup>. In base ai risultati, il trattamento con siRNA per MLL ha portato all'overespressione di FHIT in tutte le linee di leucemia acuta linfoblastica o bifenotipica, ad eccezione della linea KARPAS-45 con traslocazione MLL-AFX, mentre risulta diversamente regolato nelle linee di leucemia acuta mieloide. La risposta al trattamento è quindi positiva nelle linee di leucemia linfoblastica acuta, e ripristina il fenotipo normale dell'oncosoppressore FHIT. Anche in questo caso, un unico trattamento ha due vantaggi: oltre all'inibizione dell'oncogene di fusione di MLL, la riattivazione della funzione di oncosoppressore di FHIT.

Il gene ADAM10 (A disintegrin and metalloproteinase 10) appartiene ad una famiglia di proteine espresse sulla superficie cellulare con una struttura unica che possiede sia potenziale di adesione sia domini con funzione di proteasi. In particolare ADAM10 è una metallo proteasi che taglia diverse proteine tra cui TNF-alpha e E-cadherin. In diversi studi ADAM10 è risultato

espresso a livelli significativi in linee cellulari leucemiche <sup>[290]</sup>. In questo lavoro, ADAM10 risulta rimanere costante o leggermente upregolato in tutte le linee cellulari trattate con siRNA MLL tranne nella linea KARPAS-45 con traslocazione MLL-AFX. Si può ipotizzare che l'overespressione di ADAM10, già associata a leucemie, non sia influenzata dal trattamento contro MLL.

### 3. Analisi proteica

La difficoltà nell'analisi della proteina MLL consiste nel fatto che è una proteina di grandi dimensioni, sia la forma *wild type*, sia le forme traslocate (**Tabella 20**).

Proteina	Dimensioni (KDa)
MLL <sub>wt</sub>	485
MLL-AF9	170
MLL-AF4	240
MLL-ENL	250

**Tabella 20.** Dimensioni di MLL e delle oncoproteine di fusione di MLL.

Inoltre, le forme traslocate sono poco espresse a livello cellulare, anche nelle linee di leucemie acute con le rispettive traslocazioni di MLL (**Figura 25**).

Gli studi in letteratura prevedono il clonaggio di vettori contenenti i geni per MLL *wild type* o gli oncogeni di fusione di MLL, per permetterne l'overespressione <sup>[35,85-87,90,291-293]</sup>. In questo studio si sono volute utilizzare le linee cellulari contenenti fisiologicamente le traslocazioni di MLL, senza una loro forzata overespressione, per valutare la loro risposta fisiologica al trattamento con siRNA, e per valutare le proprietà farmacocinetiche e la dose terapeutica dei siRNA necessaria per le quantità di oncogeni di fusione di MLL presenti normalmente nelle cellule leucemiche.

In questo modo si sono avute difficoltà di rilevazione delle oncoproteine, sia *wild type*, sia traslocate (**Figura 24**).

#### 4. Analisi di bioluminescenza

La tecnologia della bioluminescenza è una metodica innovativa e di grande utilità e potenzialità nel campo della ricerca biomedica [207-210]. Numerosi lavori scientifici stanno pubblicando esperimenti su modelli bioluminescenti di diverse patologie e tumori, compresi quelli ematologici [211-218].

Il presente lavoro è il primo che approfondisce la problematica delle leucemie acute con traslocazioni di MLL dal punto di vista dello studio tramite bioluminescenza.

Le linee cellulari di leucemia acuta mieloide THP-1 e MOLM-13 con traslocazione MLL-AF9 e di leucemia acuta linfoblastica SEM con traslocazione MLL-AF4 e KOPN-8 con traslocazione MLL-ENL ingegnerizzate stabilmente con il gene per la luciferasi, hanno risposto diversamente alla trasfezione ed hanno caratteristiche peculiari di espressione della luciferasi (**Figure 26, 27**). Infatti, le analisi *in vitro* hanno mostrato per ogni una diversa intensità del segnale bioluminescente della reazione luciferina/luciferasi in correlazione al numero di cellule, ed il valore di bioluminescenza è risultato specifico per ogni linea. Quindi ogni linea deve essere considerata un'entità a sé con caratteristiche di espressione proprie.

Il successivo utilizzo di tali linee *in vivo* ha mostrato ulteriori caratteristiche proprie di ogni tipo leucemico, indicando che ogni traslocazione associata a MLL porta ad un fenotipo cellulare specifico e con caratteristiche differenti. Tutto il lavoro di questa tesi ha messo in evidenza le peculiarità di ogni tipo leucemico, confermato dalle differenti risposte ai diversi trattamenti, sia *in vitro* che *in vivo*.

## 5. Studi *in vivo*

Le cellule di leucemia acuta con traslocazione di MLL sono state utilizzate per generare modelli murini bioluminescenti di leucemia acuta con traslocazioni di MLL per studiare la progressione della leucemia a livello preclinico in maniera non invasiva per l'animale, sensibile e rapido per quanto riguarda il metodo di rilevazione (**Figura 30**).

I modelli murini bioluminescenti di leucemia acuta con traslocazioni di MLL generati in questo studio ed i risultati ottenuti sono stati sottoposti all'attenzione di importanti riviste scientifiche operanti nel campo dell'oncoematologia e della ricerca preclinica, e sono attualmente sotto revisione per una eventuale pubblicazione <sup>[238]</sup>. Inoltre, data la rilevanza scientifica dei risultati, questo lavoro è stato scelto come comunicazione orale ed esposto al Simposio AISAL Imaging e Medicina Traslazionale tenutosi a Imola il 4-5 novembre 2010, e successivamente pubblicato sulla rivista scientifica *Comparative Medicine* <sup>[239,240]</sup>. L'associazione AISAL si occupa di diffondere informazioni sul corretto uso degli animali da laboratorio, scambi di conoscenze e di esperienze in materia di sperimentazione animale; il parere favorevole espresso da AISAL nella valutazione di questo lavoro e nella scelta come presentazione orale al Simposio, ha ribadito l'importanza e la validità di questo studio volto all'approfondimento dell'andamento delle leucemie acute con traslocazione di MLL *in vivo* ed allo sviluppo di potenziali agenti terapeutici contro gli oncogeni di fusione di MLL.

L'elevata sensibilità della bioluminescenza *in vivo* permette la rilevazione del tumore in fase precoce di sviluppo, prima che si manifestino segni di sofferenza e prima che si sviluppino metastasi solide in organi periferici, e permette la rilevazione del tumore sia in superficie sia in tessuti profondi.

I modelli murini bioluminescenti di leucemia acuta con traslocazioni di MLL ricapitolano il differente andamento delle leucemie acute mieloidi infant e dell'adulto con traslocazione MLL-AF9, e la rapida aggressività delle leucemie acute linfoblastiche bifenotipiche con traslocazione MLL-ENL e MLL-AF4.

I modelli murini bioluminescenti di leucemia acuta con traslocazioni di MLL hanno mostrato diverso andamento della progressione leucemica, in particolare i modelli MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-AF9 dell'adulto hanno sviluppato la leucemia nel midollo osseo e successivamente hanno dato disseminazione tramite il circolo sanguigno ad organi periferici. Il modello MLL-AF9 infant ha mostrato generazione ed attecchimento della leucemia solo a livello del midollo osseo. Probabilmente, questo andamento può essere dovuto ad una minore tendenza di infiltrazione della leucemia MLL-AF9 infant. Inoltre, i due modelli MLL-AF9 possono avere un andamento differente dovuto alla differente origine: il modello MLL-AF9 infant è stato generato con cellule THP-1 stabilizzate dal sangue periferico di un bambino di un anno con leucemia acuta monolitica di sottotipo M5a, mentre il modello MLL-AF9 dell'adulto è stato generato con cellule MOLM-13 stabilizzate dal sangue periferico di un paziente maschio di venti anni con ricaduta di leucemia acuta monolitica di sottotipo M5a che è evoluta in sindrome mielodisplastica <sup>[243,250]</sup>.

Il modello MLL-AF9 infant ha mostrato in tutti i tipi di analisi caratteristiche di non infiltrazione e basso tasso di proliferazione (**Figure 31-34**). Il modello MLL-AF9 dell'adulto ha mostrato invece rapida proliferazione e elevata aggressività.

La bioluminescenza *in vivo* ha permesso di distinguere il diverso andamento della progressione della leucemia acuta mieloide con traslocazione MLL-AF9 infant o dell'adulto, e può essere di aiuto nello studio del

meccanismo d'azione dell'oncogene MLL-AF9 in differenti contesti come i pazienti pediatrici e adulti.

I modelli di leucemia acuta linfoblastica hanno evidenziato entrambi caratteristiche di elevata aggressività: il modello MLL-AF4 ha mostrato elevata infiltrazione a livello periferico in tutti gli organi analizzati sia tramite analisi di bioluminescenza, sia tramite osservazione clinica sia tramite analisi molecolare, mentre il modello MLL-ENL ha mostrato elevato tasso di proliferazione e aggressività in base ai risultati delle analisi di bioluminescenza (**Figure 30-34**). Questi risultati ricapitolano l'elevata aggressività delle leucemie acute linfoblastiche, ribadiscono la corrispondenza con l'andamento clinico e confermano tali modelli come ottimali per lo studio di queste leucemie.

In sintesi, il parallelismo tra i risultati della bioluminescenza *in vivo* su tutti i modelli murini bioluminescenti di leucemia acuta con traslocazioni di MLL generati e l'andamento clinico delle leucemie acute con traslocazioni di MLL supporta ulteriormente tali modelli come strumenti ottimali per lo studio delle leucemie acute con traslocazioni di MLL.

Inoltre, tali modelli possono essere complementari ai modelli transgenici di leucemie acute con traslocazioni di MLL poiché entrambi hanno la possibilità di rivelare diversi dettagli della trasformazione e della progressione della leucemia *in vivo*, e possono essere utili per la comunità scientifica per elucidare il trafficking *in vivo* delle diverse leucemie con traslocazioni di MLL [29,82,83,87,195-202,294,295].

L'accurata definizione dell'evoluzione della leucemia *in vivo* dai primi stadi di attecchimento agli stadi finali di infiltrazione dell'intero organismo in questi modelli di leucemia acuta con traslocazioni di MLL rappresenta le caratteristiche ottimali per la definizione di trattamenti preclinici per validare l'efficacia di terapie mirate per questo gruppo di leucemie così aggressive.

Grazie a queste caratteristiche, tali modelli sono stati utilizzati in questo lavoro per condurre studi pilota di trattamenti *in vivo* con siRNA contro MLL. E' risultata innanzitutto evidente la necessità di validare una metodica di *delivery in vivo* con possibilità traslabonabili in sperimentazione clinica sull'uomo.

Numerosi studi su modelli animali hanno proposto la metodica di *hydrodynamic injection* come ottimale per la *delivery* di DNA e siRNA *in vivo* <sup>[296-305]</sup>. La metodica di *hydrodynamic injection* è prevalentemente indicata per patologie al fegato in quanto il volume della soluzione iniettata nella vena caudale del topo raggiunge *in primis* i capillari epatici, ne permette l'apertura grazie all'elevata pressione, e permette la fuoriuscita della soluzione iniettata dai vasi e l'ingresso nel tessuto epatico. A livello del sistema epatico portale si ha poi la distribuzione della soluzione agli altri organi. Per questo motivo, in questo lavoro è stata scelta tale metodica in quanto le leucemie hanno un attecchimento iniziale al midollo osseo, ed una successiva distribuzione in circolo nei vasi ed ai tessuti periferici. Si è infatti potuta vedere dai risultati una diminuzione del segnale bioluminescente dei modelli trattati con la metodica di *hydrodynamic injection*, dovuta al raggiungimento della soluzione di siRNA alle cellule leucemiche attecchite nel midollo osseo, al silenziamento da parte dei siRNA dell'oncogene di fusione di MLL ed alla morte cellulare delle cellule leucemiche luminescenti (**Figura 35**). Anche a livello molecolare è stata verificata la validità del metodo tramite l'analisi Real-Time PCR per valutare il silenziamento del gene della lamina (**Figura 36**).

Tale metodica risulta quindi praticabile a livello sperimentale su piccoli animali da laboratorio, ma trova difficoltà nell'applicazione clinica, in quanto, implicando l'utilizzo di una soluzione in volume pari a circa il 10% del peso, con velocità di infusione molto elevata, rischierebbe di causare collasso cardio-circolatorio.

Si è allora passati all'utilizzo di vettori non virali, quali nanoparticelle di PEI (polyethylenimine), una molecola polimerica con un'elevata densità di cariche cationiche, che le conferisce la capacità di legarsi con alta affinità a molecole negative quali gli acidi nucleici <sup>[306-308]</sup>. Il PEI protegge gli acidi nucleici dalle nucleasi sieriche presenti nel torrente circolatorio, viene internalizzato nelle cellule per endocitosi e tampona il pH acido degli endosomi. In questo modo funge da "spugna protonica", aumentando il flusso di protoni e acqua, facendo esplodere gli endosomi e rilasciando il contenuto nel citoplasma. Questo meccanismo permette agli acidi nucleici di non essere degradati dal pH endosomiale e ne mantiene la stabilità <sup>[309-311]</sup>.

Numerosi studi hanno mostrato le proprietà del PEI per quanto riguarda la *delivery in vivo* <sup>[312-318]</sup>. Anche in questo lavoro il PEI è risultato un polimero utilizzabile per l'applicazione nel campo ematologico, in quanto in grado di raggiungere per via sistemica le cellule leucemiche attecchite a livello del midollo osseo e infiltrate negli organi periferici.

Il fattore più delicato in base ai risultati è stato definire il rapporto ottimale tra cariche di azoto positive presenti nel PEI e cariche di fosfato negative presenti nel siRNA, in quanto devono essere mantenute entrambe le caratteristiche di buona efficienza di trasfezione e bassa tossicità.

Esistono inoltre diversi tipi di molecole di PEI, differenti per quanto riguarda il peso molecolare, e la linearità o ramificazione. In base a studi preliminari e ricerche in letteratura, è stato scelto un polimero lineare di peso molecolare 25 KDa, per le sue caratteristiche di bassa tossicità e maggiore efficienza di complessazione e trasfezione <sup>[311-318]</sup>.

In base ai risultati è stato confermato che diversi rapporti di cariche mostrano risultati diversi in termini di efficienza di *delivery* (**Figure 37-39**). Un rapporto maggiore tra PEI e siRNA sembra avere effetti migliori in termini di silenziamento a rapporti più bassi; questo risultato può essere dovuto al fatto che una maggiore quantità di cariche positive da parte del PEI

favorisce l'ingresso a livello cellulare in seguito alle interazioni con le cariche negative dei fosfolipidi di membrana, mentre probabilmente una nanoparticella con meno densità di cariche positive interagisce più difficilmente con la membrana cellulare, restando a livello extracellulare e dando effetti aspecifici. Inoltre, una più bassa densità di carica potrebbe lasciare "scoperta" qualche molecola di siRNA che potrebbe essere degradata dalle nucleasi sieriche o dare effetti transitori aspecifici. L'elevata densità di cariche positive aumenta anche la capacità di tamponamento del pH acido degli endosomi, permettendo la protezione di una maggiore quantità di siRNA anche a livello intracellulare.

In base ai risultati sono stati quindi definiti il rapporto, la dose e la via di somministrazione ottimali per l'utilizzo di siRNA contro gli oncogeni di MLL complessato con PEI (**Figura 40**). Queste caratteristiche hanno reso le nanoparticelle PEI-siRNA efficienti e non tossiche per il trattamento con siRNA contro gli oncogeni di fusione di MLL nei modelli di leucemie acute con traslocazioni di MLL utilizzati negli esperimenti.

## CONCLUSIONI

Al termine di questo lavoro, è possibile affermare che con questo progetto sono stati fatti numerosi passi avanti nello studio di nuove terapie molecolari per le leucemie acute con traslocazioni di MLL.

E' sicuramente ancora necessario approfondire le funzioni del gene MLL e degli oncogeni di fusione ed il loro coinvolgimento nei processi di proliferazione ed apoptosi. Infatti, il pathway a valle di MLL è molto complesso, e numerosi fattori sono coinvolti, come visto nelle analisi di espressione genica.

Va considerato, infatti, che i migliori progressi a livello di chemioterapia sono stati raggiunti negli ultimi decenni con l'introduzione di polichemioterapie che avessero diversi bersagli terapeutici, in quanto il trattamento con un singolo agente può indurre resistenza e diminuzione della risposta alla terapia.

Gli studi sul gene MLL possono portare anche alla scoperta di ulteriori target terapeutici da bersagliare in parallelo a MLL e per sviluppare nuovi approcci terapeutici per pazienti con questo tipo di leucemia.

Il gene MLL è comunque un fattore centrale nelle leucemie acute che lo vedono coinvolto in diversi riarrangiamenti, ed è quindi un valido bersaglio terapeutico per terapie innovative, come si è voluto approfondire in questo studio. Infatti, è stata scelta l'innovativa tecnologia del silenziamento genico tramite siRNA per inibire l'espressione degli oncogeni di fusione di MLL. I siRNA progettati e validati hanno dato risultati incoraggianti sia a livello cellulare, che molecolare, che negli studi *in vivo* su modelli murini di leucemie acute con traslocazioni di MLL.

Tali risultati evidenziano quindi promettenti presupposti per ipotizzare concretamente una loro traslazione in sperimentazione a livello clinico ed

ulteriori ricerche a partire da questi presupposti possono portare velocemente alla sperimentazione preclinica e clinica di tali terapie innovative ed all'utilizzo in trattamenti mirati per questo gruppo di leucemie così aggressive.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Tura S, Bacarani M. Corso di malattie del sangue e degli organi emopoietici. Terza Edizione 2003. Società Editrice Esculapio.
2. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004;:80-97. Review
3. Pizzo PA, Poplack DG. Principle and practice of pediatric oncology, Fifth Edition 2006. Lippincott Williams & Wilkins
4. Ravindranath Y. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2003 Jan;15(1):23-35. Review.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33(4):451-8.
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985 Oct;103(4):620-5.
7. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The 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. *Ann Oncol.* 1999 Dec;10(12):1419-32.

8. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937-51. Epub 2009 Apr 8. Review.
9. Global Cancer Facts and Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society 2007.  
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/globalfactsandfigures2007rev2p.pdf>
10. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006 Mar-Apr;56(2):106-30.
11. Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori dell'età pediatrica 2008.  
[http://www.iss.it/binary/lgac/cont/TESTO\\_PEDIATRIA\\_FINALE.pdf](http://www.iss.it/binary/lgac/cont/TESTO_PEDIATRIA_FINALE.pdf)
12. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:118-45. Review.
13. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, Downing JR, Willman CL, Reed JC. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:102-31.

14. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr.* 2009 Feb;21(1):1-8.
15. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006 Nov 1;107(9):2099-107.
16. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev.* 2010 Jun;36(4):286-97. Epub 2010 Mar 12. Review.
17. Pession A, Rondelli R, Paolucci P, Pastore G, Dini G, Bonetti F, Madon E, Mandelli F, Zanesco L, Uderzo C, Prete A, Rabusin M, Ugazio A, Di Bartolomeo P, Favre C, Bojd-Faulkner L, Poggi V, Luksch R, Donfrancesco A, Argioli F, La Nasa G, Amici A, Locatelli F. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood: report from the bone marrow transplantation group of the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP). *Haematologica.* 2000 Jun;85(6):638-46.
18. Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, et al. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:10735-10739.
19. Dimartino JF, Cleary ML. Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol.* 1999 Sep;106(3):614-26.

20. Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*. 1992 71 691–700.
21. Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet*. 1992;2:113-118.
22. Daser A, Rabbitts TH. Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev*. 2004 May 1;18(9):965-74.
23. Slany RK. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*. 2009 Jul;94(7):984-93. Epub 2009 Jun 16. Review.
24. Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10632-10636.
25. Dou Y, Hess JL. Mechanisms of transcriptional regulation by MLL and its disruption in acute leukemia. *Int J Hematol*. 2008 Jan;87(1):10-8. Epub 2007 Dec 4.
26. Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood*. 1997 90(5): 1799-806.

27. Yagi H, Deguchi K, Aono A, Tani Y, Kishimoto T, Komori T. Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood*. 1998 Jul 1;92(1):108-17.
28. Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature*. 1995;378:505-508.
29. Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*. 2001 20, 5695 ± 5707
30. Rodriguez-Perales S, Cano F, Lobato MN, Rabbitts TH. MLL gene fusions in human leukaemias: in vivo modelling to recapitulate these primary tumourigenic events. *Int J Hematol*. 2008 87:3–9
31. Li ZY, Liu DP, Liang CC. New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Leukemia*. 2005 19, 183–190.
32. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The Role of HOX Homeobox Genes in Normal and Leukemic Hematopoiesis. *STEM CELL*. 199614:281-291
33. Magli, MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 88(14): 6348-52.
34. Schreiner SA, Garcia-Cuellar MP, Fey GH, Slany RK. The leukemogenic fusion of MLL with ENL creates a novel transcriptional transactivator. *Leukemia*. 1999 13(10): 1525-33.

35. Hsieh JJ, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol.* 2003 23(1): 186-94.
36. Ayton PM, Cleary ML. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev.* 2003 17(18): 2298-307.
37. Martin ME, Milne TA, Bloyer S, Galoian K, Shen W, Gibbs D, Brock HW, Slany R, Hess JL. Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell.* 2003 4(3): 197-207.
38. Kumar AR, Hudson WA, Chen W, Nishiuchi R, Yao Q, Kersey JH. Hoxa9 influences the phenotype but not the incidence of Mll-AF9 fusion gene leukemia. *Blood.* 2004 103(5): 1823-8.
39. Nie Z, Yan Z, Chen EH, Sechi S, Ling C, Zhou S, Xue Y, Yang D, Murray D, Kanakubo E, Cleary ML, Wang W. Novel SWI/SNF chromatin-remodeling complexes contain a mixed-lineage leukemia chromosomal translocation partner. *Mol Cell Biol.* 2003 23(8): 2942-52.
40. Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 97(7): 3260-5.

41. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*. 2002 2(10): 764-76.
42. Butler LH, Slany R, Cui X, Cleary ML, Mason DY. The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3361-70.
43. Ennas MG, Sorio C, Greim R, Nieddu M, Scarpa A, Orlandini S, Croce CM, Fey GH, Marschalek R. The human ALL-1/MLL/HRX antigen is predominantly localized in the nucleus of resting and proliferating peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res*. 1997 May 15;57(10):2035-41.
44. Rogaia D, Grignani F, Carbone R, Riganelli D, LoCoco F, Nakamura T, Croce CM, Di Fiore PP, Pelicci PG. The localization of the HRX/ALL1 protein to specific nuclear subdomains is altered by fusion with its eps15 translocation partner. *Cancer Res*. 1997 Mar 1;57(5):799-802.
45. Chowdhury T and Brady HJM. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2008 40 2008 192–199
46. Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, Schnittger S, Hiddemann W, Kern W, Haferlach T. New insights into MLL gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia*. 2005 Jun;19(6):953-64.

47. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Greaves M. The role of the MLL gene in infant leukemia. *Int J Hematol*. 2003 Dec;78(5):390-401. Review.
48. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Greaves M. Molecular Pathogenesis of MLL-Associated Leukemias. *International Journal of Hematology*. Received March 23, 2005; accepted April 19, 2005
49. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Liu H, Pui CH, Evans WE, Naeve C, Wong L, Downing JR. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002 Mar;1(2):133-43.
50. Greaves MF. Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. *Leukemia* 1996 10(2): 372-7.
51. Ross JA, Potter JD, Robison LL. Infant leukemia, topoisomerase II inhibitors, and the MLL gene. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Nov 16;86(22):1678-80. Review.
52. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:118-45. Review.
53. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemin-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and

- acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med.* 1993 Sep 23;329(13):909-14.
54. Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Diaz MO, Rowley JD. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood.* 1993 Dec 15;82(12):3705-11.
55. Harper DP, Aplan PD. Chromosomal Rearrangements Leading to MLL Gene Fusions: Clinical and Biological Aspects. *Cancer Res.* 2008; 68: (24). December 15, 2008
56. Daser A, Rabbitts TH. The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2005 Jun;15(3):175-88. Review.
57. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 1997 278(5340): 1059-64.
58. Birke M, Schreiner S, García-Cuéllar MP, Mahr K, Titgemeyer F, Slany RK. The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic Acids Res.* 2002 30(4): 958-65.
59. Slany RK, Lavau C, Cleary ML. The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol.* 1998 18(1): 122-9.

60. Xia ZB, Anderson M, Diaz MO, Zeleznik-Le NJ. 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*. 2003 Jul 8;100(14):8342-7. Epub 2003 Jun 26.
61. Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 1995 20(2): 56-9.
62. Fair K, Anderson M, Bulanova E, Mi H, Tropschug M, Diaz MO. Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol*. 2001 May;21(10):3589-97.
63. Zeleznik-Le NJ, Harden AM, Rowley JD. 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*. 1994 91(22): 10610-4.
64. Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NM, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ. Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 7;96(25):14372-7.
65. Milne TA, Martin ME, Brock HW, Slany RK, Hess JL. Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus,

- promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res.* 2005 Dec 15;65(24):11367-74.
66. Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell.* 2002 Nov;10(5):1119-28.
  67. Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML, Ohki M. Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3710-8. Epub 2002 Jun 28.
  68. Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2006 Nov;135(4):438-49. Epub 2006 Sep 11.
  69. Cleary ML. Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell.* 1991 Aug 23;66(4):619-22. Review.
  70. Secker-Walker LM. General Report on the European Union Concerted Action Workshop on 11q23, London, UK, May 1997. *Leukemia* 1998 12(5): 776-8.
  71. Huret JL, Dessen P, Bernheim A. An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* 2001 15(6): 987-9.
  72. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/MLL.html>

73. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJ, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, Zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsaour G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molzentin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2009 Aug;23(8):1490-9. Epub 2009 Mar 5.
74. Marschalek R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J*. 2010 Apr;277(8):1822-31. Epub 2010 Mar 4. Review.
75. Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, den Boer ML, Pieters R, Ennas MG, Angelucci E, Koehl U, Greil J, Griesinger F, Zur Stadt U, Eckert C, Szczepański T, Niggli FK, Schäfer BW, Kempinski H, Brady HJ, Zuna J, Trka J, Nigro LL, Biondi A, Delabesse E, Macintyre E, Stanulla M, Schrappe M, Haas OA, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2006 May;20(5):777-84.
76. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, Beverloo HB, Chang M, Creutzig U, Dworzak MN,

- Forestier E, Gibson B, Hasle H, Harrison CJ, Heerema NA, Kaspers GJ, Leszl A, Litvinko N, Nigro LL, Morimoto A, Perot C, Pieters R, Reinhardt D, Rubnitz JE, Smith FO, Stary J, Stasevich I, Strehl S, Taga T, Tomizawa D, Webb D, Zemanova Z, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2489-96. Epub 2009 Jun 15.
77. Pession A, Lo Nigro L, Montemurro L, Serravalle S, Fazzina R, Izzi G, Nucifora G, Slany R, Tonelli R. ArgBP2, encoding a negative regulator of ABL, is fused to MLL in a case of infant M5 acute myeloid leukemia involving 4q35 and 11q23. *Leukemia*. 2006 Jul;20(7):1310-3. Epub 2006 Apr 20.
78. Pigazzi M, Masetti R, Beghin A, Bresolin S, Di Meglio A, Gelain S, Trentin L, Baron E, Giordan M, Zangrando A, Buldini B, Leszl A, Putti MC, Rizzari C, Locatelli F, Pession A, Te Kronnie G, Basso G. MLL partner genes specify distinct gene expression profile and clinical outcome in high risk mll-rearranged pediatric myeloid leukemia. An AIEOP study. *Leukemia* 2010 [Epub ahead of print].
79. Iida S, Seto M, Yamamoto K, Komatsu H, Tojo A, Asano S, Kamada N, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. MLLT3 gene on 9p22 involved in t(9;11) leukemia encodes a serine/proline rich protein homologous to MLLT1 on 19p13. *Oncogene*. 1993 Nov;8(11):3085-92.
80. Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N, Gale RP, Lange B, Crist WM, Nowell PC, et al. 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*. 1993 May 15;90(10):4631-5.
81. Alonso CN, Longo PL, Gallego MS, Medina A, Felice MS. A novel AF9 breakpoint in MLL-AF9-positive acute monoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Apr;50(4):869-71.
82. Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, Bell S, McKenzie AN, King G, Rabbitts TH. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell*. 1996 Jun 14;85(6):853-61.
83. Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Lavenir I, Corral J, Smith AJ, Rabbitts TH. The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *EMBO J*. 1999 Jul 1;18(13):3564-74.
84. Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E. 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*. 1992 Nov 13;71(4):701-8.
85. Morrissey JJ, Raney S, Cleary ML. The FEL (AF-4) protein donates transcriptional activation sequences to Hrx-Fel fusion proteins in leukemias containing T(4;11)(Q21;Q23) chromosomal translocations. *Leuk Res*. 1997 21(10): 911-7.

86. Bitoun E, Oliver PL, Davies KE. The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet.* 2007 Jan 1;16(1):92-106. Epub 2006 Nov 29.
87. Bursen A, Schwabe K, Rüster B, Henschler R, Ruthardt M, Dingermann T, Marschalek R. The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood.* 2010 Apr 29;115(17):3570-9. Epub 2010 Mar 1.
88. Gaussmann A, Wenger T, Eberle I, Bursen A, Bracharz S, Herr I, Dingermann T, Marschalek R. Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene.* 2007 May 17;26(23):3352-63. Epub 2006 Nov 27.
89. Pui CH, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM, Carroll A, Eden OB, Evans WE, Gardner H, Harbott J, Harms DO, Harrison CJ, Harrison PL, Heerema N, Janka-Schaub G, Kamps W, Masera G, Pullen J, Raimondi SC, Richards S, Riehm H, Sallan S, Sather H, Shuster J, Silverman LB, Valsecchi MG, Vilmer E, Zhou Y, Gaynon PS, Schrappe M. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia.* 2003 Apr;17(4):700-6. Review.
90. Rubnitz JE, Morrissey J, Savage PA, Cleary ML. 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.* 1994 84(6): 1747-52.

91. Parry P, Wei Y, Evans G. Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosom Cancer*. 1994 11:79.
92. Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene*. 1997 Jan 16;14(2):195-202.
93. So CW, Cleary ML. MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Mol Cell Biol*. 2002 Sep;22(18):6542-52.
94. Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H, Huebner K, Gale RP, Nowell PC, Kuriyama K, et al. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res*. 1993 Dec 1;53(23):5624-8.
95. Gu Y, Alder H, Nakamura T, Schichman SA, Prasad R, Canaani O, Saito H, Croce CM, Canaani E. Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res*. 1994 May 1;54(9):2327-30.
96. Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood*. 1997 Nov 1;90(9):3714-9.

97. Joh T, Yamamoto K, Kagami Y, Kakuda H, Sato T, Yamamoto T, Takahashi T, Ueda R, Kaibuchi K, Seto M. Chimeric MLL products with a Ras binding cytoplasmic protein AF6 involved in t(6;11) (q27;q23) leukemia localize in the nucleus. *Oncogene*. 1997 Oct 2;15(14):1681-7.
98. Kuriyama M, Harada N, Kuroda S, Yamamoto T, Nakafuku M, Iwamatsu A, Yamamoto D, Prasad R, Croce C, Canaani E, Kaibuchi K. Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J Biol Chem*. 1996 Jan 12;271(2):607-10.
99. Liedtke M, Ayton PM, Somerville TC, Smith KS, Cleary ML. Self-association mediated by the Ras association 1 domain of AF6 activates the oncogenic potential of MLL-AF6. *Blood*. 2010 Jul 8;116(1):63-70. Epub 2010 Apr 15.
100. Rossbach M. Small non-coding RNAs as novel therapeutics. *Curr Mol Med*. 2010 Jun;10(4):361-8.
101. Wahlestedt C. Natural antisense and noncoding RNA transcripts as potential drug targets. *Drug Discov Today*. 2006 Jun;11(11-12):503-8. Review.
102. Aronin N. Target selectivity in mRNA silencing. *Gene Ther*. 2006 Mar;13(6):509-16. Review.
103. Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem*. 2001 Apr 2;2(4):239-45. Review.

104. Manoharan M. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol.* 2004 Dec;8(6):570-9. Review.
105. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):343-9. Review.
106. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
107. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/fire-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/fire-lecture.html)
108. Kim SS, Garg H, Joshi A, Manjunath N. Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo. *Trends Mol Med.* 2009 Nov;15(11):491-500. Epub 2009 Oct 19. Review.
109. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):25-33.
110. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001 Jan 15;15(2):188-200.
111. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):494-8.

112. Wacheck V, Zangemeister-Wittke U. Antisense molecules for targeted cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006 Jul;59(1):65-73. Epub 2006 Jun 5. Review.
113. Wall NR, Shi Y. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet*. 2003 Oct 25;362(9393):1401-3. Review.
114. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DW. Review. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006 Dec;2(12):711-9. Review.
115. Mroz EA, Rocco JW. RNA interference: natural, experimental, and clinical roles in cancer biology. *Head Neck*. 2006 Dec;28(12):1132-41. Review.
116. Kawasaki H, Taira K. Transcriptional gene silencing by short interfering RNAs. *Curr Opin Mol Ther*. 2005 Apr;7(2):125-31. Review.
117. Sledz CA, Williams BR. RNA interference in biology and disease. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):787-94. Epub 2005 Apr 12. Review.
118. Cejka D, Losert D, Wacheck V. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond)*. 2006 Jan;110(1):47-58. Review.
119. Aigner A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Aug;76(1):9-21. Epub 2007 Apr 25. Review.

120. Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Apr;3(4):318-29. Review.
121. Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci.* 2001 Dec;114(Pt 24):4557-65.
122. Malecová B, Morris KV. Transcriptional gene silencing through epigenetic changes mediated by non-coding RNAs. *Curr Opin Mol Ther.* 2010 Apr;12(2):214-22.
123. Werner A. Natural antisense transcripts. *RNA Biol.* 2005 Apr;2(2):53-62. Epub 2005 Apr 19. Review.
124. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer.* 2007 Jul;43(10):1529-44. Epub 2007 May 24. Review.
125. He Z, Sontheimer EJ. "siRNAs and miRNAs": a meeting report on RNA silencing. *RNA.* 2004 Aug;10(8):1165-73. No abstract available.
126. Tachikawa K, Briggs SP. Targeting the human genome. *Curr Opin Biotechnol.* 2006 Dec;17(6):659-65. Epub 2006 Nov 7. Review.
127. Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):3623-32. Review.
128. Akhtar S, Benter I. Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity

- and specificity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Mar 30;59(2-3):164-82. Epub 2007 Mar 21. Review.
129. Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther.* 2006 Apr;13(4):644-70. Epub 2006 Feb 14. Review.
130. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003 Jun;21(6):635-7. Epub 2003 May 18.
131. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science.* 2002 Sep 13;297(5588):1833-7. Epub 2002 Aug 22.
132. Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature.* 2004 Sep 9;431(7005):211-7. Epub 2004 Aug 15. Retraction in: Taira K. *Nature.* 2006 Jun 29;441(7097):1176.
133. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle.* 2006 Sep;5(18):2103-9. Epub 2006 Sep 15. Review.
134. Kawakami S, Hashida M. Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007 Jun;22(3):142-51. Review.

135. Amarzguioui M, Lundberg P, Cantin E, Hagstrom J, Behlke MA, Rossi JJ. Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat Protoc.* 2006;1(2):508-17.
136. Juliano R, Alam MR, Dixit V, Kang H. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul;36(12):4158-71. Epub 2008 Jun 16. Review.
137. White PJ. Barriers to successful delivery of short interfering RNA after systemic administration. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 Nov;35(11):1371-6. Epub 2008 Jun 18. Review.
138. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Feb;8(2):129-38. Review. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Jun;8(6):516.
139. Singh SK, Hajeri PB. siRNAs: their potential as therapeutic agents-- Part II. Methods of delivery. *Drug Discov Today.* 2009 Sep;14(17-18):859-65. Epub 2009 Jun 21. Review.
140. Gao X, Kim KS, Liu D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J.* 2007 Mar 23;9(1):E92-104. Review.
141. Corey DR. Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):3615-22. Review.
142. Kim WJ, Kim SW. Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharm Res.* 2009 Mar;26(3):657-66. Epub 2008 Nov 18.

143. Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. Review. *J Control Release*. 2007 Aug 16;121(1-2):64-73. Epub 2007 May 26.
144. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):38-9.
145. Filleur S, Courtin A, Ait-Si-Ali S, Guglielmi J, Merle C, Harel-Bellan A, Clézardin P, Cabon F. SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer Res*. 2003 Jul 15;63(14):3919-22.
146. Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA*. 2003 Sep;9(9):1034-48.
147. De Paula D, Bentley MV, Mahato RI. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. *RNA*. 2007 Apr;13(4):431-56. Epub 2007 Feb 28. Review.
148. Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther*. 2006 Sep;13(18):1313-9. Review.
149. Novobrantseva TI, Akinc A, Borodovsky A, de Fougères A. Delivering silence: advancements in developing siRNA therapeutics. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2008 Mar;11(2):217-24. Review.

150. de Fougérolles AR. Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Hum Gene Ther.* 2008 Feb;19(2):125-32. Review.
151. Sioud M. RNA interference and innate immunity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Mar 30;59(2-3):153-63. Epub 2007 Mar 16. Review.
152. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougérolles A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):263-70. Epub 2005 Feb 20.
153. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet.* 2003 Jul;34(3):263-4.
154. Schlee M, Hornung V, Hartmann G. siRNA and isRNA: two edges of one sword. *Mol Ther.* 2006 Oct;14(4):463-70. Epub 2006 Jul 31.
155. Chen W, Liu M, Cheng G, Yan W, Fei L, Zheng Z. RNA silencing: a remarkable parallel to protein-based immune systems in vertebrates? *FEBS Lett.* 2005 Apr 25;579(11):2267-72.
156. Katze MG, Wambach M, Wong ML, Garfinkel M, Meurs E, Chong K, Williams BR, Hovanessian AG, Barber GN. Functional expression and RNA binding analysis of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated, 68,000-Mr protein kinase in a cell-free system. *Mol Cell Biol.* 1991 Nov;11(11):5497-505.

157. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*. 1990 Jul 27;62(2):379-90.
158. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;311:1-16.
159. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):732-8.
160. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9742-7. Epub 2001 Jul 31.
161. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*. 2005 Apr;23(4):457-62. Epub 2005 Mar 20.
162. Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther*. 2006 Mar;13(3):494-505. Epub 2005 Dec 15.
163. Judge AD, Robbins M, Tavakoli I, Levi J, Hu L, Fronda A, Ambegia E, McClintock K, MacLachlan I. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J*

Clin Invest. 2009 Mar;119(3):661-73. doi: 10.1172/JCI37515. Epub 2009 Feb 23.

164. Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Aug 10;61(10):850-62. Epub 2009 May 5. Review.
165. Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr Drug Targets.* 2010 Mar;11(3):345-60.
166. Huang C, Li M, Chen C, Yao Q. Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications. *Expert Opin Ther Targets.* 2008 May;12(5):637-45.
167. Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 23;102(34):12177-82. Epub 2005 Aug 9.
168. Aharinejad S, Sioud M, Lucas T, Abraham D. Targeting stromal-cancer cell interactions with siRNAs. *Methods Mol Biol.* 2009;487:243-66.
169. Pirollo KF, Chang EH. Targeted delivery of small interfering RNA: approaching effective cancer therapies. *Cancer Res.* 2008 Mar 1;68(5):1247-50.

170. Suyama E, Kawasaki H, Wadhwa R, Taira K. Cell migration and metastasis as targets of small RNA-based molecular genetic analyses. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004;25(4-5):303-8.
171. Höbel S, Koburger I, John M, Czubayko F, Hadwiger P, Vornlocher HP, Aigner A. Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically with Bevacizumab. *J Gene Med.* 2010 Mar;12(3):287-300.
172. Folini M, Pennati M, Zaffaroni N. RNA interference-mediated validation of genes involved in telomere maintenance and evasion of apoptosis as cancer therapeutic targets. *Methods Mol Biol.* 2009;487:303-30.
173. Lu PY, Xie FY, Woodle MC. Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics. *Trends Mol Med.* 2005 Mar;11(3):104-13.
174. Pei Y, Tuschl T. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods.* 2006 Sep;3(9):670-6. Review.
175. Patel DJ, Ma JB, Yuan YR, Ye K, Pei Y, Kuryavyi V, Malinina L, Meister G, Tuschl T. Structural biology of RNA silencing and its functional implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:81-93. Review.

176. Yuan B, Latek R, Hossbach M, Tuschl T, Lewitter F. siRNA selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *NAR* 2004 32:W130-W134
177. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* (2004) 22(3):326-330.
178. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *NAR* (2004) 32(3):936-948.
179. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 2002 Feb;26(2):199-213.
180. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. 1999 13: 3191-3197.
181. Peek AS, Behlke MA. Design of active small interfering RNAs. *Curr Opin Mol Ther*. 2007 Apr;9(2):110-8. Review.
182. Yiu SM, Wong PWH, Lam TW, Mui YC, Kung HF, Lin M, Cheung YT. Filtering of Ineffective siRNAs and Improved siRNA Design Tool. *Bioinformatics* 2005 21(2): 144-151.

183. Cui W, Ning J, Naik UP, Duncan MK. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput Methods Programs Biomed.* 2004 Jul;75(1):67-73.
184. Wang L, Mu FY. A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. *Bioinformatics* (2004) 20(11):1818-20.
185. Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *NAR* (2004) 32:W124-W129.
186. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
187. <http://genome.ucsc.edu/>
188. <http://sfold.wadsworth.org>
189. <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>
190. Paigen K. Understanding the human condition: experimental strategies in mammalian genetics. *ILAR J.* 2002;43(3):123-35.
191. Paigen K. A miracle enough: the power of mice. *Nat Med.* 1995 Mar;1(3):215-20. Review.
192. Russell W.M.S., Burch R.L., *The Principle of Humane Experimental Technique*, Methuen, London 1959.).
193. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527-530.

194. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells*. 1998;16(3):166-77.
195. Chen W, Li Q, Hudson WA, Kumar A, Kirchoff N, Kersey JH. A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood*. 2006 Jul 15;108(2):669-77. Epub 2006 Mar 21.
196. Rabbitts TH, Appert A, Chung G, Collins EC, Drynan L, Forster A, Lobato MN, McCormack MP, Pannell R, Spandidos A, Stocks MR, Tanaka T, Tse E. Mouse models of human chromosomal translocations and approaches to cancer therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2001 Jan-Feb;27(1):249-59. Review.
197. Collins EC, Pannell R, Simpson EM, Forster A, Rabbitts TH. Inter-chromosomal recombination of Mll and Af9 genes mediated by cre-loxP in mouse development. *EMBO Rep*. 2000 Aug;1(2):127-32.
198. Somervaille TC, Cleary ML. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2006 Oct;10(4):257-68.
199. Fortier JM, Graubert TA. Murine models of human acute myeloid leukemia. *Cancer Treat Res*. 2010;145:183-96.
200. Macor P, Secco E, Zorzet S, Tripodo C, Celeghini C, Tedesco F. An update on the xenograft and mouse models suitable for investigating

- new therapeutic compounds for the treatment of B-cell malignancies. *Curr Pharm Des.* 2008;14(21):2023-39. Review.
201. Kennedy JA, Barabé F. Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. *Leukemia.* 2008 Nov;22(11):2029-40. Epub 2008 Aug 7. Review.
202. Graber JH, Churchill GA, Dipetrillo KJ, King BL, Petkov PM, Paigen K. Patterns and mechanisms of genome organization in the mouse. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006 Sep 1;305(9):683-8. Review.
203. <http://www.ministerosalute.it>
204. Russell W.M.S., “The development of the Three R’s concept”, *ATLA*, 23, pp.298-304, 1995.
205. <http://www.aisal.org/>
206. <http://www.felasa.eu/>
207. Dothager RS, Flentie K, Moss B, Pan MH, Kesarwala A, Piwnicka-Worms D. Advances in bioluminescence imaging of live animal models. *Curr Opin Biotechnol.* 2009 Feb;20(1):45-53. Epub 2009 Feb 23. Review.
208. Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med.* 2008 Jan;49(1):1-4. Epub 2007 Dec 12. Review.

209. Klerk CP, Overmeer RM, Niers TM, Versteeg HH, Richel DJ, Buckle T, Van Noorden CJ, van Tellingen O. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals. *Biotechniques*. 2007 Jul;43(1 Suppl):7-13, 30. Review.
210. Greer LF, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*. 2002 Jan-Feb;17(1):43-74.
211. Söling A, Rainov NG. Bioluminescence imaging in vivo - application to cancer research. *Expert Opin Biol Ther*. 2003 Oct;3(7):1163-72. Review. Erratum in: *Expert Opin Biol Ther*. 2003 Dec;3(8):1315.
212. Negrin RS, Contag CH. In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6(6):484-90.
213. Wetterwald A, van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs J, Karperien M, Löwik CW, Gautschi E, Thalmann GN, Cecchini MG. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol*. 2002;160(3):1143-53.
214. Virostko J, Radhika A, Poffenberger G, Chen Z, Brissova M, Gilchrist J, Coleman B, Gannon M, Jansen ED, Powers AC. Bioluminescence imaging in mouse models quantifies beta cell mass in the pancreas and after islet transplantation. *Mol Imaging Biol*. 2010 Jan-Feb;12(1):42-53. Epub 2009 Jun 23.

215. Toyoshima M, Tanaka Y, Matumoto M, Yamazaki M, Nagase S, Sugamura K, Yaegashi N. Generation of a syngeneic mouse model to study the intraperitoneal dissemination of ovarian cancer with in vivo luciferase imaging. *Luminescence*. 2009 Sep-Oct;24(5):324-31.
216. Mezzanotte L, Fazzina R, Michelini E, Tonelli R, Pession A, Branchini B, Roda A. In vivo Bioluminescence Imaging of Murine Xenograft Cancer Models with a Red-shifted Thermostable Luciferase. *Mol Imaging Biol*. 2010 Aug;12(4):406-14. Epub 2009 Nov 25.
217. Inoue Y, Izawa K, Tojo A, Nomura A, Sekine R, Oyaizud N, Ohtomo K. Monitoring of disease progression by bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging in an animal model of hematologic malignancy. *Experimental Hematology* 35 (2007) 407–415.
218. Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, Kobayashi S, Tojob A, Ohtomo K. Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model. *Experimental Hematology* 2008;36:1634–1641.
219. Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):377-82. Epub 2001 Dec 18.
220. Chopra A. *Gaussia princeps* luciferase . *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2010. 2008 Jan 31 [updated 2008 Feb 28].

221. Prescher JA, Contag CH. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Curr Opin Chem Biol.* 2010 Feb;14(1):80-9. Epub 2009 Dec 3. Review.
222. Maes W, Deroose C, Reumers V, Krylyshkina O, Gijbbers R, Baekelandt V, Ceuppens J, Debyser Z, Van Gool SW. In vivo bioluminescence imaging in an experimental mouse model for dendritic cell based immunotherapy against malignant glioma. *J Neurooncol.* 2009 Jan;91(2):127-39. Epub 2008 Sep 12.
223. Contag CH, Bachmann MH. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:235-60. Epub 2002 Mar 22. Review.
224. O'Neill K, Lyons SK, Gallagher WM, Curran KM, Byrne AT. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J Pathol.* 2010 Feb;220(3):317-27.
225. Inoue Y, Kiryu S, Izawa K, Watanabe M, Tojo A, Ohtomo K. Comparison of subcutaneous and intraperitoneal injection of D-luciferin for in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009 May;36(5):771-9. Epub 2008 Dec 19.
226. Wang X, Rosol M, Ge S, Peterson D, McNamara G, Pollack H, Kohn DB, Nelson MD, Crooks GM. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3478-82. Epub 2003 Aug 28.

227. Hollingshead MG, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP, Shoemaker R, Melillo G, Sausville EA. A potential role for imaging technology in anticancer efficacy evaluations. *Eur J Cancer*. 2004 Apr;40(6):890-8.
228. Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, Pieters R, Kersey JH, Sallan SE, Fletcher JA, Golub TR, Griffin JD, Korsmeyer SJ. Inhibition of FLT3 in MLL: Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell*. 2003 Feb;3(2):173-83.
229. Surguladze D, Steiner P, Prewett M, Tonra JR. Methods for evaluating effects of an irinotecan + 5-fluorouracil/leucovorin (IFL) regimen in an orthotopic metastatic colorectal cancer model utilizing in vivo bioluminescence imaging. *Methods Mol Biol*. 2010;602:235-52.
230. Assessment of cetuximab efficacy by bioluminescence monitoring of intracranial glioblastoma xenograft in mouse. *J Neurooncol*. 2009 Oct;95(1):23-8. Epub 2009 Apr 21. Yang SH, Hong YK, Jeun SS, Kim IS, Hong JT, Sung JH, Son BC, Lee SW, Kim MC, Lee KS.
231. Sun H, Pisle S, Gardner ER, Figg WD. Bioluminescent imaging study: FAK inhibitor, PF-562,271, preclinical study in PC3M-luc-C6 local implant and metastasis xenograft models. *Cancer Biol Ther*. 2010 Jul;10(1):38-43. Epub 2010 Jul 9.
232. Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):640-8. Epub 2002 Sep 26.

233. Hong h, Zhang Y, Cai W. In vivo Imaging of RNA Interference. *J Nucl Med* 2010; 51:169–172.
234. Viel T, Boisgard R, Kuhnast B, Jego B, Siquier-Pernet K, Hinnen F, Dollé F, Tavitian B. Molecular imaging study on in vivo distribution and pharmacokinetics of modified small interfering RNAs (siRNAs). *Oligonucleotides*. 2008 Fall;18(3):201-12.
235. Svensson RU, Shey MR, Ballas ZK, Dorkin JR, Goldberg M, Akinc A, Langer R, Anderson DG, Bumcrot D, Henry MD. Assessing siRNA pharmacodynamics in a luciferase-expressing mouse. *Mol Ther*. 2008 Dec;16(12):1995-2001. Epub 2008 Sep 9.
236. Zhang GJ, Safran M, Wei W, Sorensen E, Lassota P, Zhelev N, Neuberg DS, Shapiro G, Kaelin WG Jr. Bioluminescent imaging of Cdk2 inhibition in vivo. *Nat Med*. 2004 Jun;10(6):643-8. Epub 2004 May 2.
237. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:5-8.
238. Fazzina R, Lombardini L, Mezzanotte L, Roda A, Hrelia P, Pession A, Tonelli R. Generation of bioluminescent mll-positive acute leukemias in mice reveals different mll-fusion genes dependent tumor progressions.
239. [www.aisal.org](http://www.aisal.org)

240. Lombardini L, Fazzina R, Mezzanotte L, Roda A, Hrelia P, Pession A, Tonelli R. Generation of Bioluminescent MLL-Positive Acute Leukemia Mice Reveals Different MLL-Related Tumor Progressions. *Comparative Medicine* 2010 December, Vol 60, No 6, pag 407.
241. Montemurro L, Tonelli R, Fazzina R, Martino V, Marino F, Pession A. Identification of two MLL-MLLT3 (alias MLL-AF9) chimeric transcripts in the MOLM-13 cell line. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;154(1):96-7.
242. 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.
243. 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.* 1980;26(2):171-6.
244. Odero MD, Zeleznik-Le NJ, Chinwalla V, Rowley JD. Cytogenetic and molecular analysis of the acute monocytic leukemia cell line THP-1 with an MLL-AF9 translocation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Dec;29(4):333-8.
245. Kawagoe H, Kawagoe R, Sano K. Targeted down-regulation of MLL-AF9 with antisense oligodeoxyribonucleotide reduces the expression of

the HOXA7 and -A10 genes and induces apoptosis in a human leukemia cell line, THP-1. *Leukemia*. 2001 Nov;15(11):1743-9.

246. Akao Y, Mizoguchi H, Misiura K, Stec WJ, Seto M, Ohishi N, Yagi K. Antisense oligodeoxyribonucleotide against the MLL-LTG19 chimeric transcript inhibits cell growth and induces apoptosis in cells of an infantile leukemia cell line carrying the t(11;19) chromosomal translocation. *Cancer Res*. 1998 Sep 1;58(17):3773-6.
247. Kumar AR, Yao Q, Li Q, Sam TA, Kersey JH. t(4;11) leukemias display addiction to MLL-AF4 but not to AF4-MLL. *Leuk Res*. 2010 Sep 23.
248. Thomas M, Gessner A, Vornlocher HP, Hadwiger P, Greil J, Heidenreich O. Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3559-66. Epub 2005 Jul 26.
249. Kim SH, Mok H, Jeong JH, Kim SW, Park TG. Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. *Bioconj Chem*. 2006 Jan-Feb;17(1):241-4.
250. Matsuo Y, MacLeod RA, Uphoff CC, Drexler HG, Nishizaki C, Katayama Y, Kimura G, Fujii N, Omoto E, Harada M, Orita K (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*. 1997 Sep;11(9):1469-77.
251. Ziegler-Heitbrock HWL, Thiel E, Fütterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 1988 41:456-461.
252. MacLeod RAF, Voges M, Drexler HG. Mono Mac 6: A mature monoblastic leukemia cell line with t(9:11)(p21;q23). *Blood* (1994) 82:3221-3222.
253. <http://www.monocytes.de/>
254. Kato Y, Ogura M, Okumura M, Morishima Y, Hotta T, Ohno R, Hirabayashi N, Saito H. Establishment and characterization of a peroxidase positive, human monocytic leukemia cell line (NOMO-1). *Acta Haematol Jpn* 1986 49:277 (abstr).
255. Herrmann R, Han T, Barcos MP, Lok MS, Henderson ES. Malignant lymphoma of pre-T-cell type terminating in acute myelocytic leukemia. Case report with enzymic and immunological marker studies. *Cancer (Phila.)* 1980 46: 1383-1388.
256. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Sandberg AA. Cytogenetic characterization of putative human myeloblastic leukemia cell lines (ML-1, -2, and -3): origin of the cells. *Cancer Res.* 1986 Jul;46(7):3642-7.

257. Tanabe S, Zeleznik-Le NJ, Kobayashi H, Vignon C, Espinosa R 3rd, LeBeau MM, Thirman MJ, Rowley JD. Analysis of the t(6;11)(q27;q23) in leukemia shows a consistent breakpoint in AF6 in three patients and in the ML-2 cell line. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Apr;15(4):206-16.
258. Greil J, Gramatzki M, Burger R, Marschalek R, Peltner M, Trautmann U, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Fey GH, Stehr K, et al. (1994) The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol*. 1994 Feb;86(2):275-83.
259. Matsuo Y, Drexler HG (1998) Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leukemia Res* 1998;22: 567–579.
260. Stong RC, Korsmeyer SJ, Parkin JL, Arthur DC, Kersey JH. Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. *Blood*. 1985 Jan;65(1):21-31.
261. Horstmann M, Argyriou-Tirita A, Borkhardt A, Kabisch H, Kapaun P, Winkler K, Haas OA. MLL/ENL fusion in congenital acute lymphoblastic leukemia with a unique t(11;18;19). *Cancer Genet Cytogenet*. 1996 Jun;88(2):103-9.
262. Rubnitz JE, Behm FG, Curcio-Brint AM, Pinheiro RP, Carroll AJ, Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR. Molecular analysis of

- t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. *Blood*. 1996 Jun 1;87(11):4804-8.
263. Karpas A, Hayhoe FGJ, Greenberger JS, Barker CR, Cawley JC, Lowenthal RM, Moloney WC. The establishment and cytological, cytochemical and immunological characterisation of human haemic cell lines: Evidence for heterogeneity. *Leuk Res* 1977 1, 35-49.
264. Schulte CE, Von Lindern M, Steinlein P, Beug H, Wiedemann LM. MLL-ENL cooperates with SCF to transform primary avian multipotent cells. *Embo J* 2002 21(16): 4297-306.
265. Johnson JJ, Chen W, Hudson W, Yao Q, Taylor M, Rabbitts TH, Kersey JH. Prenatal and postnatal myeloid cells demonstrate stepwise progression in the pathogenesis of MLL fusion gene leukemia. *Blood* 2003 101(8): 3229-35.
266. Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 1999 13(5): 687-98.
267. Lawrence HJ, Rozenfeld S, Cruz C, Matsukuma K, Kwong A, Komuves L, Buchberg AM, Largman C. Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* 1999 13(12): 1993-9.
268. Afonja O, Smith JE Jr, Cheng DM, Goldenberg AS, Amorosi E, Shimamoto T, Nakamura S, Ohyashiki K, Ohyashiki J, Toyama K,

- Takeshita K. MEIS1 and HOXA7 genes in human acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2000 24(10): 849-55.
269. Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, Zeng C, Baron A, Hunger SP, Varella-Garcia M, Gemmill R, Brizard F, Brizard A, Roche J. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002 16(2): 186-95.
270. Imamura T, Morimoto A, Takanashi M, Hibi S, Sugimoto T, Ishii E, Imashuku S. Frequent co-expression of HoxA9 and Meis1 genes in infant acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangement. *Br J Haematol* 2002 119(1): 119-21.
271. Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Menezes RX, Reinhardt D, Hollink IH, Peters ST, van Wering ER, Kaspers GJ, Cloos J, de Bont ES, Cayuela JM, Baruchel A, Meyer C, Marschalek R, Trka J, Sary J, Beverloo HB, Pieters R, Zwaan CM, Den Boer ML. Evaluation of gene expression signatures predictive for cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010 Oct 22.
272. Wu Y, Shang X, Sarkissyan M, Slamon D, Vadgama JV. FOXO1A is a target for HER2-overexpressing breast tumors. *Cancer Res*. 2010 Jul 1;70(13):5475-85. Epub 2010 Jun 15.
273. Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*. 2002 Jul;2(1):81-91.

274. Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):41114-23. Epub 2004 Jul 21.
275. Tonelli R, Sartini R, Fronza R, Freccero F, Franzoni M, Dongiovanni D, Ballarini M, Ferrari S, D'Apolito M, Di Cola G, Capranico G, Khobta A, Campanini R, Paolucci P, Minucci S, Pession A. G1 cell-cycle arrest and apoptosis by histone deacetylase inhibition in MLL-AF9 acute myeloid leukemia cells is p21 dependent and MLL-AF9 independent. *Leukemia.* 2006 Jul;20(7):1307-10. Epub 2006 Apr 13.
276. Wiederschain D, Kawai H, Gu JJ, Shilatifard A, Yuan ZM. Molecular Basis of p53 Functional Inactivation by the Leukemic Protein MLL-ELL. *Molecular and Cellular Biology*, June 2003, p. 4230-4246, Vol. 23, No. 12.
277. Wiederschain D, Kawai H, Shilatifard A, Yuan ZM. Multiple Mixed Lineage Leukemia (MLL) Fusion Proteins Suppress p53-mediated Response to DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry* July 1, 2005, 280, 24315-24321.
278. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 2002;30:41-47.

279. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2010 Nov;22(6):646-55.
280. Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*. 1996 Apr;10(4):588-99.
281. Poppe B, Vandesompele J, Schoch C, Lindvall C, Mroćzek K, Bloomfield CD, Berna Beverloo H, Michaux L, Dastugue N, Herens C, Yigit N, De Paepe A, Hagemeijer A, Speleman F. Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood* 2004 1 January, Volume 103, Number 1, 229-235
282. Rozovskaia T, Ravid-Amir O, Tillib S, Getz G, Feinstein E, Agrawal H, Nagler A, Rappaport EF, Issaeva I, Matsuo Y, Kees UR, Lapidot T, Lo Coco F, Foa R, Mazo A, Nakamura T, Croce CM, Cimino G, Domany E, Canaani E. Expression profiles of acute lymphoblastic and myeloblastic leukemias with ALL-1 rearrangements. *PNAS* 2003 June 24, vol. 100 no. 13 7853–7858.
283. Pession A, Tonelli R. The MYCN oncogene as a specific and selective drug target for peripheral and central nervous system tumors. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005 Jun;5(4):273-83.
284. Pession A, Trerè D, Perri P, Rondelli R, Montanaro L, Mantovani W, Derenzini M, Paolucci G. N-myc amplification and cell proliferation rate in human neuroblastoma. *J Pathol*. 1997 Nov;183(3):339-44.

285. Tonelli R, Purgato S, Camerin C, Fronza R, Bologna F, Alboresi S, Franzoni M, Corradini R, Sforza S, Faccini A, Shohet JM, Marchelli R, Pession A. Anti-gene peptide nucleic acid specifically inhibits MYCN expression in human neuroblastoma cells leading to cell growth inhibition and apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2005 May;4(5):779-86.
286. Pession A, Tonelli R, Fronza R, Sciamanna E, Corradini R, Sforza S, Tedeschi T, Marchelli R, Montanaro L, Camerin C, Franzoni M, Paolucci G. Targeted inhibition of NMYC by peptide nucleic acid in N-myc amplified human neuroblastoma cells: cell-cycle inhibition with induction of neuronal cell differentiation and apoptosis. *Int J Oncol.* 2004 Feb;24(2):265-72.
287. Meeker ND, Cherry AM, Bangs CD, Frazer JK. A Pediatric B Lineage Leukemia With Coincident MYC and MLL Translocations. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010 Sep 8. [Epub ahead of print]
288. Heldin P, Karousou E, Bernert B, Porsch H, Nishitsuka K, Skandalis SS. Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):215-8. Review.
289. Stam RW, den Boer ML, Passier MM, Janka-Schaub GE, Sallan SE, Armstrong SA, Pieters R. Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2006 Feb;20(2):264-71.
290. Wu E, Croucher PI, McKie N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived

from a range of haematological malignancies. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jun 18;235(2):437-42.

291. Caslini C, Shilatifard A, Yang L, Hess JL. The amino terminus of the mixed lineage leukemia protein (MLL) promotes cell cycle arrest and monocytic differentiation. *PNAS* March 14, 2000 vol. 97 no. 6 2797–2802.
292. Joh T, Hosokawa Y, Suzuki R, Takahashi T, Seto M. 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.* 1999 Jan 28;18(4):1125-30.
293. Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* (2009) 23, 2197–2209.
294. Barabé F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the Initiation and Progression of Human Acute Leukemia in Mice. *Science* 27 april 2007 Vol 316.
295. Cozzio A, Passegué E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes & development* 2003 17:3029–3035.

296. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High Levels of Foreign Gene Expression in Hepatocytes after Tail Vein Injections of Naked Plasmid DNA. *Human gene therapy* 1999 July 1, 10:1735–1737.
297. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):38-9.
298. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet*. 2002 Sep;32(1):107-8. Epub 2002 Jul 29.
299. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA, Liu D. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther*. 2004 Apr;11(8):675-82.
300. Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet*. 2005;54:3-20. Review.
301. Budker VG, Subbotin VM, Budker T, Sebestyén MG, Zhang G, Wolff JA. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. II. Morphological studies. *J Gene Med*. 2006 Jul;8(7):874-88.
302. Sebestyén MG, Budker VG, Budker T, Subbotin VM, Zhang G, Monahan SD, Lewis DL, Wong SC, Hagstrom JE, Wolff JA. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med*. 2006 Jul;8(7):852-73.

303. Bartlett DW, Davis ME. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 12;34(1):322-33. Print 2006.
304. Bartlett DW, Davis ME. Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing. *Biotechnol Bioeng.* 2007 Jul 1;97(4):909-21.
305. Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, Whitehorne M, Zhang X, Fabre JW. Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application. *Curr Gene Ther.* 2009 Apr;9(2):128-35. Review.
306. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release* 60 (1999) 149–160.
307. Richards Grayson AC, Doody AM, Putnam D. Biophysical and Structural Characterization of Polyethylenimine-Mediated siRNA Delivery in Vitro. *Pharmaceutical Research*, Vol. 23, No. 8, August 2006.
308. Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of Biotechnology* 124 (2006) 12–25.
309. Kircheis R, Wightman L, Wagner E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 53 (2001) 341–358.

310. Yasunori Saito<sup>1</sup>, Yuriko Higuchi<sup>1</sup>, Shigeru Kawakami<sup>1</sup>, Fumiyoshi Yamashita<sup>1</sup>, And Mitsuru Hashida. Immunostimulatory Characteristics Induced by Linear Polyethyleneimine/plasmid DNA Complexes in Cultured Macrophages. *Human Gene Therapy* 2008.013
311. Shim MS, Kwon YJ. Acid-Responsive Linear Polyethylenimine for Efficient, Specific, and Biocompatible siRNA Delivery. *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20 (3), 488-499.
312. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 7297-7301, August 1995.
313. Zou SM, Erbacher P, Remy JS, Behr JP. Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med* 2000; 2: 128±134.
314. Wiseman JW, Goddard CA, McLelland D, Colledge WH. A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Therapy* (2003) 10, 1654–1662.
315. Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubyko F, Aigner A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Therapy* (2005) 12, 461–466.

316. de Wolf HK, Snel CJ, Verbaan FJ, Schiffelers RM, Hennink WE, Storm G. Effect of cationic carriers on the pharmacokinetics and tumor localization of nucleic acids after intravenous administration. *International Journal of Pharmaceutics* 331 (2007) 167–175.
317. Bonnet ME, Erbacher P, Bolcato-Bellemin AL. Systemic Delivery of DNA or siRNA Mediated by Linear Polyethylenimine (L-PEI) Does Not Induce an Inflammatory Response. *Pharmaceutical Research* July 2008.
318. Intra J, Salem AK. Characterization of the transgene expression generated by branched and linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles in vitro and after intraperitoneal injection in vivo. *J Control Release*. 2008 September 10; 130(2): 129–138.