

# The Role of Nucleoporin Genes in Human Leukemias

## INTRODUZIONE

Il mio progetto di ricerca, finanziato dall' Associazione Damiano per l'Ematologia, si è inserito in un più ampio studio di caratterizzazione delle lesioni genetiche che sottendono allo sviluppo e all'evoluzione delle leucemie, portato avanti nel Laboratorio di Citogenetica e Genetica Molecolare dell'Università degli Studi di Perugia.

Frequentemente tali alterazioni genetiche sono dei riarrangiamenti cromosomici (soprattutto traslocazioni) che portano alla giustapposizione di due geni normalmente localizzati in siti cromosomici differenti. Nel mio progetto mi sono occupata della caratterizzazione di tali riarrangiamenti, con particolare riferimento a quelli che coinvolgono i geni codificanti per le Nucleoporine (NUPs), una famiglia di proteine localizzate sulla membrana nucleare in complessi dei Complessi del Poro Nucleare (*NPC, Nuclear Pore Complex*).

### **1. Generazione e validazione di nuovi test di FISH per l'individuazione di riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti le Nucleoporine.**

Ho selezionato da database internazionali (<http://genome.ucsc.edu/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) le sonde per i 30 geni delle Nucleoporine noti (Tabella 1).

GENE/MAP	CENTROMERIC	SPANNING	TELOMERIC	GENE/MAP	CENTROMERIC	SPANNING	TELOMERIC
<i>TPR1q25</i>	CTD-2367E21		RP11-295K2	<i>NUP188/9q34</i>	RP11-98H23		RP11-167N5
<i>NUP133/1q42</i>	RP11-777H3		RP11-831L16	<i>NUP214/9q34</i>	RP11-143H20	RP11-544A12	
<i>TMEM48/1p32</i>	RP11-467K23		RP11-28K12	<i>NUP188/9q34</i>	RP11-98H23		RP11-167N5
<i>RANBP2/2q13</i>		RP11-348G16	RP11-84C2	<i>NUP160/11p11.2</i>	RP11-346F1		RP11-112L21
<i>NUP35/2q32</i>	RP11-598C21		RP11-438L19	<i>NUP98/11p15</i>	RP11-348A20		CTD-3234F16
<i>NUP210/3p25</i>	RP11-624P22		RP11-221A8	<i>AAAS/12q13</i>	RP11-263F18	RP11-94B10	
<i>SEC13/3p25</i>	CTD-2237O15		RP11-640P1	<i>NUP107/12q15</i>	RP11-637A17		RP11-154P16
<i>NUP54/4q21</i>	CTD-2533K7		RP11-299J2	<i>NUP37/12q23</i>		RP11-554E23	RP11-721B7
<i>NUP155/5p13</i>	RP11-256L20		RP11-715N2	<i>NUPL1/13q12</i>	RP11-252I8		RP11-134M17
<i>NUP153/6p22</i>	RP11-1148P14		RP11-331C24	<i>NUP93/16q13</i>	RP11-343H19		RP11-598N6
<i>NUP43/6q25</i>	RP11-69I17	RP11-350J20		<i>NUP88/17p13</i>	RP11-373N8		RP11-680K3
<i>NUPL2/7p15</i>		RP11-314O16	RP11-79D17	<i>NUP85/17q25</i>	CTD-2381O13		RP11-16C1
<i>POM121/7q11.2</i>	CTD-2591O16		RP11-81K15	<i>SEH1L/18p11.2</i>	RP11-240N19		RP11-133H15
<i>NUP205/7q33</i>	RP11-459C6		RP11-644N4	<i>NUP62/19q13.3</i>	CTD-2238M9	CTC-326K19	
<i>GLE1/9q34</i>	RP11-187B3 RP11-339B21		RP11-216B9	<i>RAE1/20q13.3</i>	RP11-196I19		RP11-256F8
<i>NUP214/9q34</i>	RP11-143H20	RP11-544A12		<i>NUP50/22q13</i>	RP11-367O12	RP11-1005D7	RP11-1005D7

Tabella 1. Sonde per i geni delle Nucleoporine

Ho cresciuto, marcato e validato tutte le sonde su campioni normali per poi utilizzarli su pazienti selezionati dal nostro database, nonché da databases di gruppi collaboratori.

Tale screening ha permesso di individuare un'inversione del cromosoma 2 (*inv(2)(p23q13)*) coinvolgente il gene della nucleoporina *NUP358* in un paziente pediatrico. In tale caso, il terzo descritto al mondo, il riarrangiamento causa la giustapposizione del gene *ALK*, codificante per un recettore ad attività tirosin-chinasica, con *NUP358* (Figura 1).

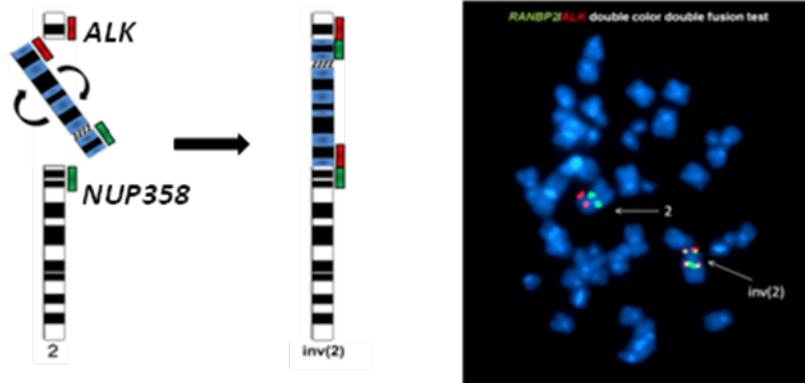


Figura 1. *inv(2)(p23q13)* individuata mediante lo screening diagnostico messo a punto per il gene *NUP358*.

Inoltre, mediante il test diagnostico così validato, è stato possibile fare diagnosi molecolare di leucemia mieloide acuta (LAM) in due pazienti che al cariotipo non presentavano anomalie. In entrambi, infatti, l'analisi in FISH per il gene *NUP98* ha evidenziato una traslocazione *t(5;11)(q35;p15)* che altrimenti non sarebbe stata individuata (Figura 2a). Successivamente, in entrambi i pazienti ho confermato, mediante PCR, clonaggio e sequenziamento, la presenza del trascritto di fusione *NUP98/NSD1*, noto per essere coinvolto nella trasformazione leucemica, nonché del suo reciproco *NSD1/NUP98* derivati dalla traslocazione (Figura 2b). Tale metodica ha contribuito, quindi, ad una diagnosi precoce di malattia e alla scelta dell'indirizzo terapeutico per entrambi i pazienti.

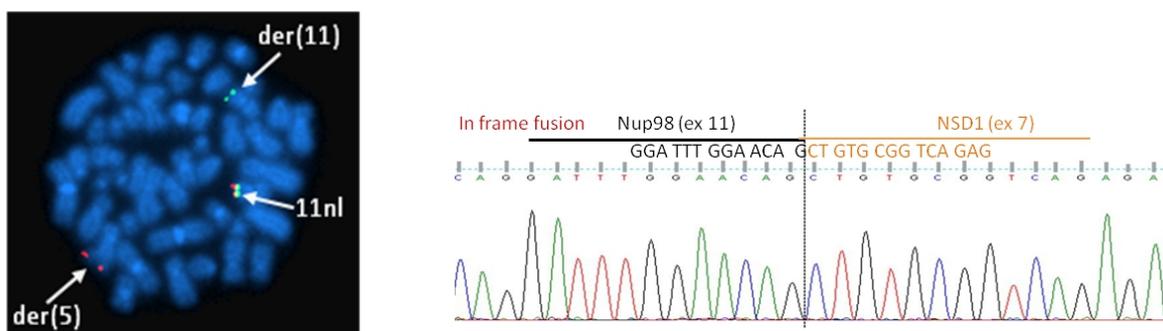


Figura 2. a) *t(5;11)(q35;p15)* individuata tramite FISH. b) Conferma della presenza del trascritto di fusione *NUP98/NSD1*.

Lo stesso test di FISH mi ha portato ad individuare un nuovo caso con riarrangiamento del gene *NUP98*, ma questa volta in un paziente di 39 anni in Crisi Blastica di Leucemia Mieloide Cronica (LMC). In tale caso, l'analisi di citogenetica convenzionale aveva evidenziato una traslocazione t(7;11)(p15;p15) oltre alla t(9;22)(q34;q11) tipica dei pazienti affetti da LMC. L'analisi in FISH ha messo in evidenza il riarrangiamento di *NUP98* con la sonda che copre il locus dei geni *HOXA* (Figura 3), un cluster di geni sul 7p15 coinvolti nello sviluppo e nel differenziamento.

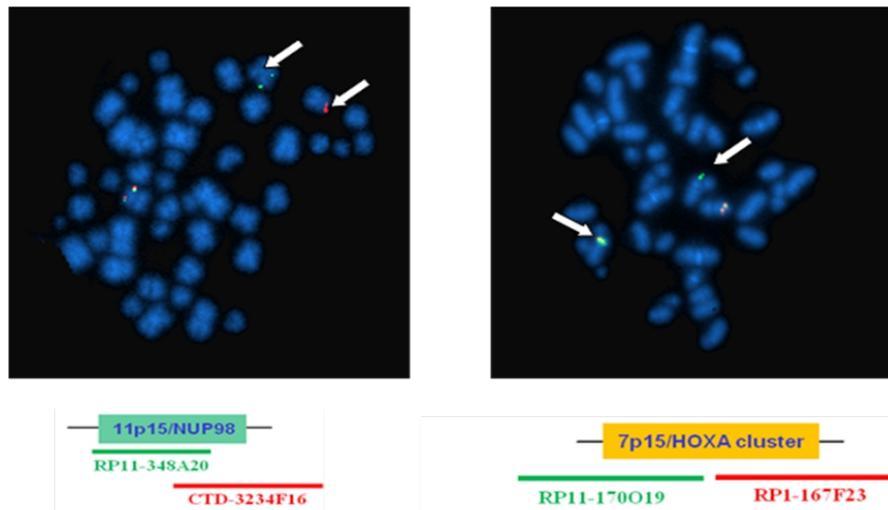


Figura 3. Il gene *NUP98* riarrangia con un gene appartenente al cluster *HOXA* in un paziente con LMC.

Dall'analisi di FISH, tuttavia, non era possibile individuare con esattezza quale dei 13 geni *HOXA* fosse coinvolto nella traslocazione.

## 2. Caratterizzazione molecolare dei riarrangiamenti delle Nucleoporine e identificazione di nuovi partners di traslocazione

L'analisi in FISH e i dati presenti in letteratura mi hanno permesso di individuare tre come possibili geni "candidati" nel riarrangiamento con *NUP98*, ossia *HOXA-9*, *-11* e *-13*. Per questo ho progettato dei primers forward per *NUP98* e reverse per tutti i 3 *HOXA* (Tabella 2), al fine di eseguire delle reazioni di nested- e seminested-PCR per mettere in evidenza gli eventuali trascritti di fusione.

<b><i>NUP98_1083F</i></b> 5'-ggtaataccagcaccataggacag-3'	<b><i>HOXA9_1036R</i></b> 5'-tgtggcctgaggtttagagc-3'
	<b><i>HOXA9_736R</i></b> 5'-cagttccagggtctggtgtt-3'
<b><i>NUP98_1252F</i></b> 5'-cttactacatttgaagcac-3'	<b><i>HOXA9_736R</i></b> 5'-cagttccagggtctggtgtt-3'
	<b><i>HOXA9_708R</i></b> 5'-gggcaccgcttttccgagt-3'
<b><i>NUP98_1083F</i></b>	<b><i>HOXA11_837R</i></b> 5'-ctctcggatctggtacttggt-3'
<b><i>NUP98_1252F</i></b>	<b><i>HOXA11_837R</i></b>
<b><i>NUP98_1083F</i></b>	<b><i>HOXA13_992R</i></b> 5'-cctcctataggagctggcat-3
<b><i>NUP98_1252F</i></b>	
<b><i>NUP98_1400F</i></b> 5'-acctgggactcttgaactg-3'	<b><i>HOXA13_992R</i></b>

Tabella 2. Primers usati in nested- e seminested-PCR per la caratterizzazione del trascritto di fusione.

Solo utilizzando primers reverse per il gene *HOXA13* veniva messa in evidenza la presenza di un trascritto di fusione (Figura 4); esso è stato recuperato, clonato in pGEM T-easy vector e sequenziato con metodo Sanger.

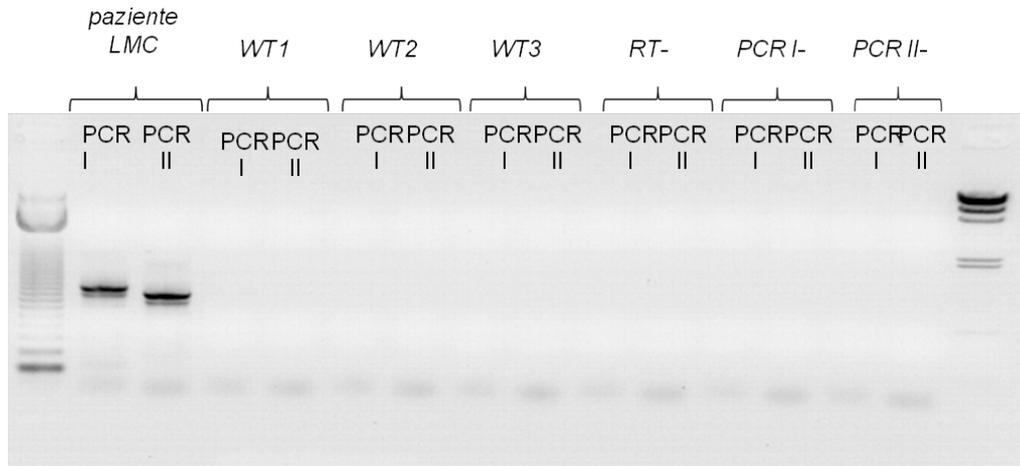


Figura 4. La semi-nested PCR ha evidenziato la presenza di un trascritto di fusione nel paziente in esame utilizzando i primers reverse per *HOXA13*.

L'analisi della sequenza mi ha permesso di caratterizzare la fusione in frame tra l'esone 16 di *NUP98* e l'esone 2 di *HOXA13* (Figura 5).

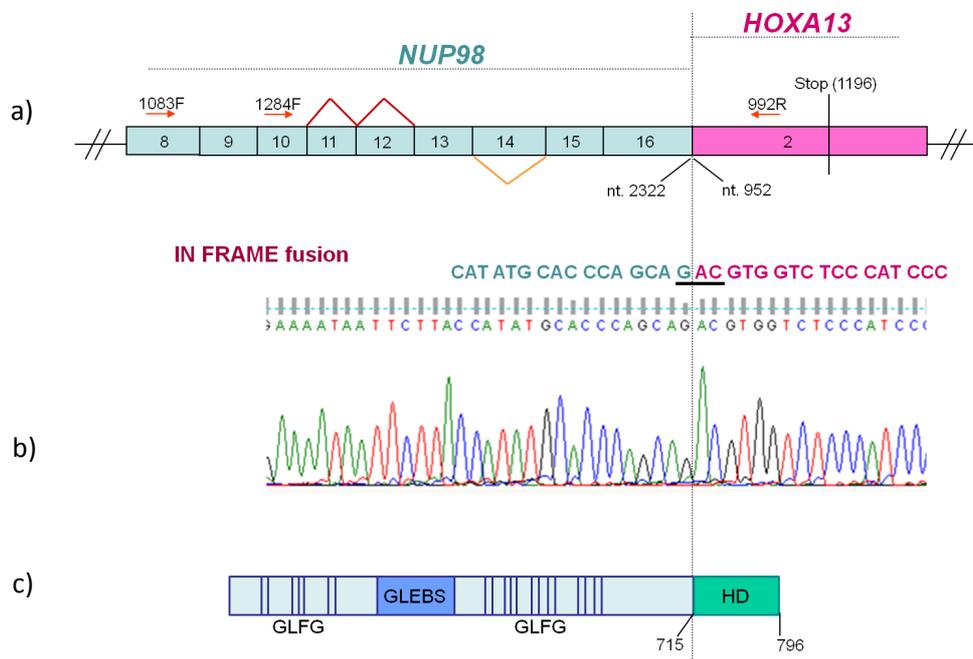


Figura 5. a) rappresentazione schematica e b) sequenza del trascritto di fusione *NUP98/HOXA13*. c) L'ipotetica proteina di fusione conserva le GLFG-repeats e il dominio GLEBS, caratteristici di *NUP98*, e l'homeodomain (HD) dell'homeobox.

Sono state individuate anche due isoforme in frame della fusione con splicing alternativo dell'esone 11 e 12 rispettivamente (triangoli rossi in Figura 5) ed una out of frame mancante dell'esone 14 (triangolo giallo in Figura 5).

Questa è la prima evidenza di tale lesione genetica in pazienti con LMC.

Come tutti i trascritti di fusione di *NUP98* anche quello appena individuato conserva l' N-terminale del gene, con il dominio FG/GLFG che media il trasporto sia dell' RNA che delle proteine. Il partner di fusione al C-terminale è un homeobox, che conserva il suo homeodomain (HD) con capacità di legare il DNA (Moore et al 2007) (Figura 5c). Poiché le proteine di fusione di *NUP98* sono note per esibire il loro potenziale oncogenico attraverso l'attivazione trascrizionale dei geni target (Nakamura et al 2005), il passo successivo del mio lavoro è stato quello di indagare il ruolo della traslocazione t(7;11) e del gene di fusione *NUP98/HOXA13* nell'evoluzione leucemica del paziente in studio.

### **3. Studio del ruolo dei riarrangiamenti delle Nucleoporine nell'evoluzione leucemica.**

Il gene *MSI2* (17q22) è un membro della famiglia *Musashi* (*Msi*) molto conservata durante l'evoluzione e distribuita nel compartimento staminale sia neuronale che ematopoietico (Sakakibara et al 2001). Nelle malattie mieloidi sono note due traslocazioni coinvolgenti *MSI2* al 17q22 (Barbouti et al 2003; De Weer et al 2008), mentre sono state riportate sei mutazioni del gene in tumori solidi (COSMIC database <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>). Nel topo Ito et al. (Ito et al 2010) hanno mostrato che la fusione *Nup98/HoxA9* contribuisce all'evoluzione verso la fase acuta di LMC, detta crisi blastica, attraverso il legame dell' homeodomain di HoxA9 al promotore di *Msi2*, causandone un'over-espressione. Ciò determina l' attivazione della via di Notch1 che deregola l'equilibrio proliferazione/differenziazione nella cellula staminale ematopoietica (Nishimoto 2010). Tale deregolazione è associata a prognosi infausta in LMC (Ito et al 2010), leucemia acuta mieloide (LAM) (Thol et al 2007) e leucemia acuta linfoblastica a cellule B (LAL-B) (Mu et al 2013). Come primo step, quindi, sono andata a valutare l'espressione del gene *MSI2* nel paziente in esame mediante real time PCR (qPCR). A tale scopo ho selezionato delle sonde TaqMan per

*MSI2* (Hs00292670\_m1) e per due geni reference *GUSB* (Hs00939627\_m1) e *B2M* (Hs00984230\_m1). Nell'analisi ho ampliato la casistica con dei controlli positivi di over-espressione, ossia le LAM con mutazione del gene *NPM1* (Thol et al 2012), dei controlli negativi (campioni wild type, wt), altre crisi blastiche e delle fasi croniche di LMC. L'analisi di espressione è stata effettuata utilizzando l' LC480 (Roche) e mediante il metodo della Seconda Derivata Massima. Da tale analisi è emerso che il caso in esame over-esprime il gene *MSI2* (Figura 6). Tale over-espressione è paragonabile a quella osservata nelle LAM *NPM1+* e si osserva anche in altri due casi di crisi blastica di LMC. È interessante notare che tali due pazienti (BC1 e BC2 in Figura 6) sono gli unici casi di crisi blastica che al cariotipo presentano lesioni cromosomiche aggiuntive alla presenza del cromosoma Ph+. Dato che la FISH per i geni *NUP98*, *MSI2* e *HOXA* è risultata normale, ciò che emerge è che oltre le fusioni di *NUP98* ci sono meccanismi alternativi di attivazione di *MSI2* che non sono ancora noti.

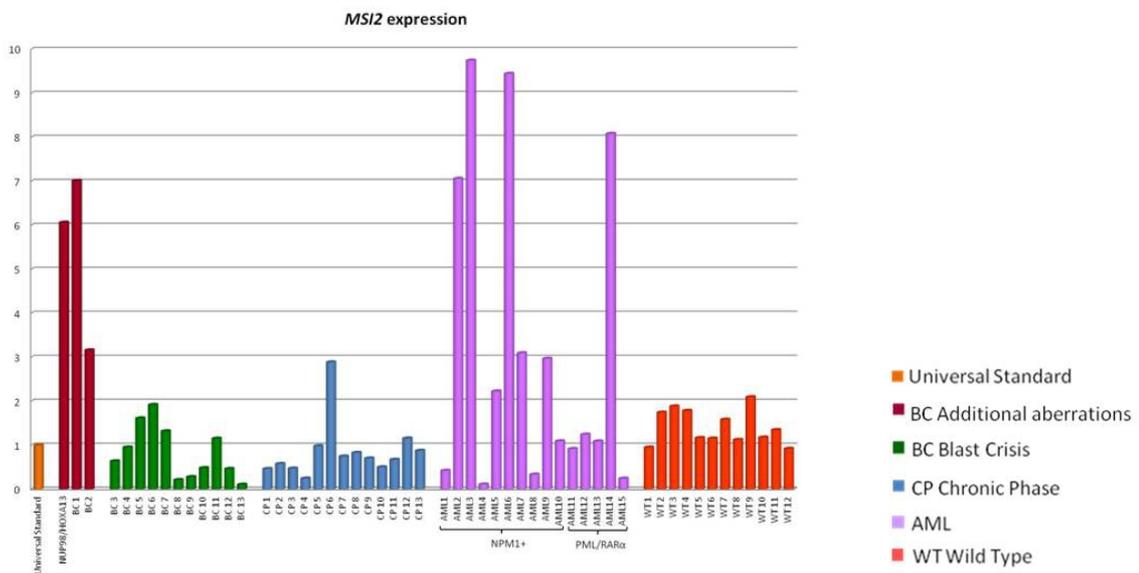


Figura 6. Il gene *MSI2* è over-espresso nel paziente in esame e negli altri due casi di crisi blastica che hanno lesioni aggiuntive al cromosoma Ph (BC1-2).

Poiché nel lavoro di Ito et al è spesso associata un'over-espressione di *HOXA9* a quella di *MSI2*, ho verificato se essa fosse presente nei miei tre casi in BC con lesioni aggiuntive al cromosoma Ph. L'analisi mostra che solo il paziente con fusione NUP98/*HOXA13* ha anche over-espressione di *HOXA9*, mentre i due casi BC1 e BC2 no (Figura 7). Per cui, nel caso in studio i due geni *HOXA9* e *MSI2* sembrano essere correlati.

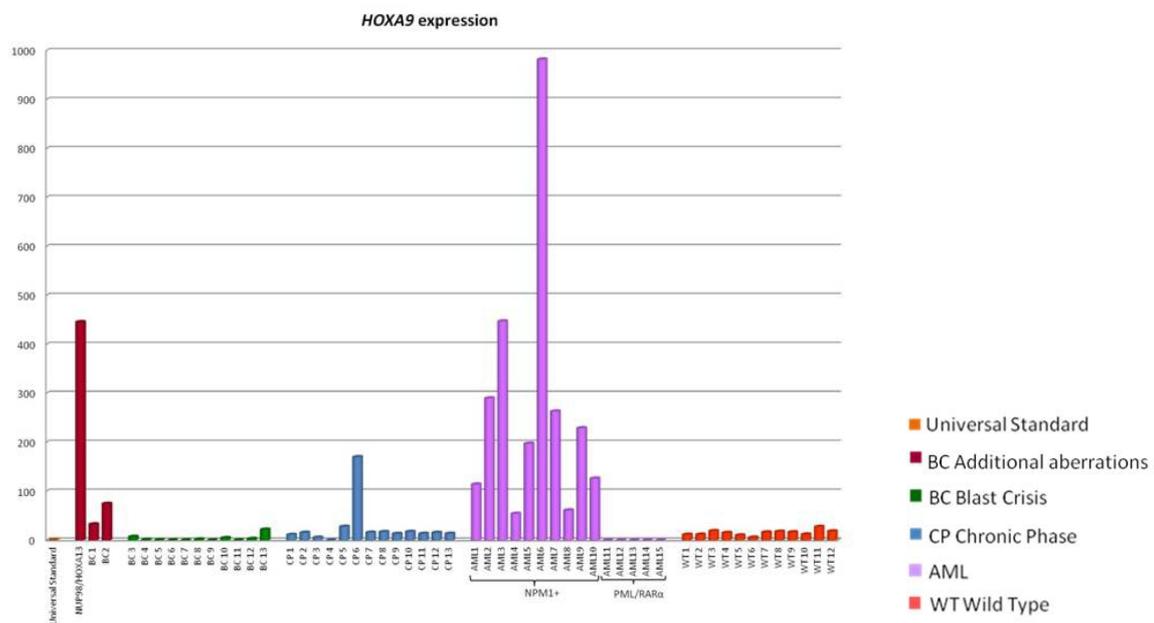


Figura 7. Il gene *NOXA9* è over-espresso nel paziente in esame, ma non negli altri due casi di crisi blastica che hanno lesioni aggiuntive al cromosoma Ph (BC1-2).

Dato il progressivo emergere del gene *MSI2* come protagonista del processo di evoluzione leucemica, a questo punto del mio progetto ho cercato di capire perché esso fosse deregolato nel paziente in studio. Poiché è noto che *HOXA9* si lega al promotore di *MSI2* determinandone un'over-espressione, e poiché *HOXA9* ed *HOXA13* hanno un'elevata omologia di sequenza, mi sono chiesta se la de-regolazione osservata nel paziente fosse direttamente dovuta alla fusione NUP98/*HOXA13*, oppure fosse mediata da *HOXA9*.

Per capirlo ho effettuato degli esperimenti di Immunoprecipitazione della Cromatina (ChIP), utilizzando un anticorpo contro NUP98 e dei primers specifici per il promotore sia di *MSI2* che di *HOXA9*. Tali esperimenti hanno dimostrato che la fusione NUP98/HOXA13 è in grado di legare entrambi i promotori.

In tal modo ho potuto proporre un modello per spiegare l'over-espressione di *MSI2* nel paziente in studio e, quindi, la sua evoluzione leucemica: la fusione NUP98/HOXA13 induce un aumento dell'espressione di *HOXA9*; le due proteine hanno un effetto sinergico nel legare *MSI2* causandone un aumento dell'espressione (Figura 8).

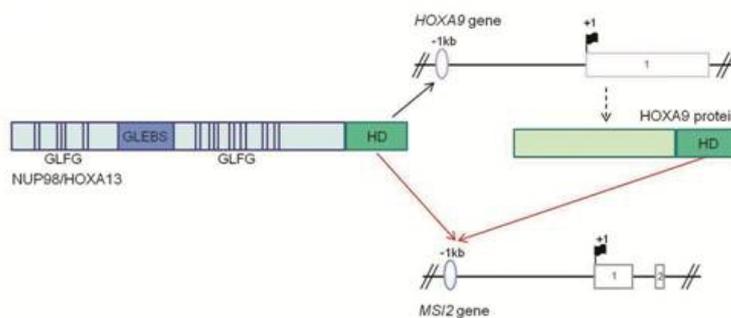


Figura 8. Effetto sinergico di NUP98/HOXA13 e HOXA9 nell'indurre la deregolazione di *MSI2*.

In conclusione, tale progetto ha consentito di fare nuove diagnosi di leucemie caratterizzate da riarrangiamenti delle Nucleoporine che altrimenti non sarebbero state caratterizzate, ed ha contribuito a spiegare il ruolo leucemogeno di tali riarrangiamenti.