

BASE MOLECOLARE DELLE MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE E SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE

Mario Cazzola

Clinica Ematologica, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

Base di partenza e razionale

Le malattie mieloproliferative croniche comprendono la leucemia mieloide cronica, la policitemia vera, la trombocitemia essenziale e la mielofibrosi idiopatica. Questi disordini sono caratterizzati da proliferazione clonale di cellule emopoietiche, eccessiva produzione di cellule ematiche con complicanze secondarie, instabilità genomica delle cellule clonali e variabile tendenza alla trasformazione blastica terminale. Mentre la base molecolare della leucemia mieloide cronica Philadelphia-positiva è nota da tempo, poco si sapeva fino a due anni fa circa le altre condizioni morbose, che vengono complessivamente definite malattie mieloproliferative croniche *Philadelphia-negative*. Partendo da un'anomalia cromosomica (disomia uniparentale del cromosoma 9p), abbiamo studiato e ristretto la regione cromosomica di perdita di eterozigotità, identificando un gene candidato, JAK2, che codifica per una proteina importante per la trasduzione del segnale indotto dai fattori di crescita emopoietici. Abbiamo sequenziato il gene JAK2 in diversi pazienti con malattia mieloproliferativa cronica e abbiamo individuato in una parte dei casi un'unica mutazione somatica, la mutazione JAK2 (V617F). JAK2 (V617F) è una "gain-of-function mutation", in quanto la proteina jak2 mutata trasduce più efficientemente il segnale indotto dal legame dei fattori di crescita ai loro specifici recettori (eritropoietina, G-CSF, trombopoietina) e riduce l'apoptosi delle cellule emopoietiche. Abbiamo poi definito il seguente modello patogenetico multifasico: a) primo evento: mutazione somatica spontanea JAK2 (V617F) e proliferazione clonale di una cellula emopoietica eterozigote; b) secondo evento: ricombinazione mitotica in una cellula emopoietica eterozigote per JAK2 (V617F), perdita di eterozigotità del cromosoma 9p ed espansione di un clone di cellule omozigoti per JAK2 (V617F).

Nonostante numerosi lavori recenti, rimane da definire il ruolo preciso di JAK2 (V617F) nella patogenesi delle malattie mieloproliferative croniche, e in particolare si deve capire come una singola mutazione si associ a fenotipi clinici diversi. Si sa inoltre che nei pazienti JAK2 (V617F)-negativi possono riscontrarsi sia altre mutazioni di JAK2 sia mutazioni attivanti del gene MPL, che codifica per il recettore della trombopoietina. Infine, è di fondamentale importanza sviluppare nuove molecole che siano in grado di agire a livello dei meccanismi patogenetici molecolari, vale dire delle proteine jak2 ed mpl mutanti.

La mielofibrosi idiopatica (*Idiopathic Myelofibrosis*, IM) è una malattia mieloproliferativa caratterizzata da fibrosi del midollo, osteopetrosi, neo-angiogenesi ed estensiva ematopoiesi extramidollare. Sono stati sviluppati due modelli animali della malattia. Il primo modello è rappresentato da topi che sono stati soggetti a manipolazioni che aumentano i livelli *in vivo* di trombopoietina (TPO) (topi TPO^{high}), il fattore di crescita che regola la megacariocitopoiesi. Infatti, sia topi transgenici per TPO che animali trapiantati con cellule staminali infettate con un retrovirus che contiene il gene per la TPO umana, o ancora, animali trattati sistematicamente con questo fattore di crescita, sviluppano tutti una sindrome simile alla IM e muoiono per le

conseguenze della malattia in 2-3 mesi. Il secondo modello è rappresentato da animali geneticamente modificati in modo da esprimere bassi livelli del fattore di trascrizione Gata1, mediante delezione del primo enhancer e del promotore distale del gene (topi Gata1low). Questi mutanti sono vitali alla nascita ma i neonati sono trombocitopenici e anemici. Gli animali recuperano dall'anemia a 3-4 settimane dalla nascita ma rimangono trombocitopenici per tutta la vita a causa di un blocco nella maturazione dei megacariociti (MK) in pro-piastrine, con conseguente accumulo di MK nel midollo. Questi mutanti sviluppano una sindrome simile alla IM nell'uomo caratterizzata dalla presenza di anemia, emazie a goccia e progenitori emopoietici in circolo, fibrosi midollare e foci di ematopoiesi nel fegato dopo 15 mesi. La storia naturale di questi animali, permette di definire almeno tre fasi distinte dello sviluppo della malattia. Una fase pre-sintomatica (da 1 a 6 mesi di età), una fase iniziale (8-12 mesi), in cui la malattia può essere documentata solo istologicamente, e una fase mielofibrotica (15 mesi alla morte naturale), in cui gli animali sviluppano tutti i tratti della malattia umana. La causa genetica dell'insorgenza della IM nell'uomo non è ancora chiara. Infatti, la mutazione V617FJak2, che risulta in una forma della proteina incapace di disattivarsi dopo aver tradotto il segnale, la cui presenza caratterizza le malattie mieloproliferative, è stata identificata in 30-50% dei pazienti con IM. Jak2 rappresenta il primo elemento del segnale di traduzione della TPO. In questo senso, quindi, la presenza della mutazione V617FJak2 è funzionalmente equivalente alla mutazione TPOhigh. In contrasto, mutazioni nel gene Gata1 non sono state identificate fino ad ora in pazienti con IM. Tuttavia, i livelli della proteina GATA-1 negli MK di questi pazienti sono chiaramente ridotti.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Nei prossimi tre anni condurremo ricerche finalizzate a raggiungere i seguenti obiettivi. Innanzitutto, svilupperemo metodi che forniscano una valutazione quantitativa della percentuale di alleli JAK2 (V617F), utilizzando sia la PCR quantitativa sia la tecnologia dei microchip. Utilizzando queste tecnologie cercheremo poi altre mutazioni attivanti di JAK2 e di MPL nei pazienti JAK2 (V617F)-negativi. Studieremo in particolare inibitori di TGF-beta nel modello murino GATA-1low della mielofibrosi. A partire dal terzo anno condurremo trial clinici di fase I-II per valutare l'efficacia clinica di nuove molecole aventi attività contro le proteine jak2 ed mpl mutanti, e di molecole capaci di inibire TGF-beta.

I principali obiettivi del progetto di ricerca sono elencati di seguito:

- sviluppo di metodi efficienti che forniscano una valutazione quantitativa della percentuale di alleli JAK2 (V617F), utilizzando in particolare la PCR quantitativa e la tecnologia dei microchip;
- utilizzo di dati molecolari per stabilire correlazioni fra genotipo (stato mutazionale di JAK2 e di MPL, proporzione di cellule emopoietiche interessate) e fenotipo, ovvero alterazioni ematologiche e quadro clinico, con l'obiettivo di arrivare ad una classificazione molecolare delle malattie mieloproliferative croniche;
- sviluppo di modelli murini transgenici di malattia mieloproliferativa basati sulla specifica lesione genica finalizzati al loro uso per testare potenziali farmaci anti-JAK2;
- studio di nuove molecole che possano essere efficaci nel sopprimere i cloni mieloproliferativi attraverso un'azione inibitoria nei confronti delle proteine jak2 ed mpl mutanti, e loro valutazione sia in modelli cellulari che in modelli murini;
- attivazione (a partire dal terzo anno) di trial clinici di fase I-II per valutare l'efficacia di nuove molecole aventi attività anti-jak2 e anti-mpl e di molecole capaci di inibire TGF-beta.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Base molecolare delle malattie mieloproliferative croniche e sviluppo di nuove terapie

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
S. Matteo (Mario Cazzola)	UO1 (San Matteo: Mario Cazzola)	San Matteo	Mario Cazzola
		San Matteo	Mario Lazzarino
		San Matteo	Giovanni Barosi
		Experimental Hematology, Basel	Radek Skod
	UO2 (ISS: Anna Rita Migliaccio)	ISS	Anna Rita Migliaccio
		Università di Chieti	Rosa Alba Rana

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Negli ultimi due anni sono state condotte le ricerche e sono stati ottenuti i risultati descritti di seguito.

1. *Neoplasie mieloproliferative familiari e predisposizione genetica all'acquisizione di mutazioni di JAK2*

Abbiamo studiato la prevalenza e le caratteristiche cliniche delle neoplasie mieloproliferative familiari. In una coorte di 458 pazienti affetti da neoplasia mieloproliferativa, i casi familiari sono risultati pari a 75 (35 famiglie), per una prevalenza del 7,6%. Non abbiamo osservato significative differenze cliniche fra casi familiari e casi sporadici: questo indica che le due condizioni sono molto simili, e che gli individui interessati – siano essi casi sporadici o familiari – hanno in comune una predisposizione genetica all'acquisizione di mutazioni di JAK2 e di MPL. Abbiamo altresì documentato l'accorciamento progressivo dei telomeri, e dimostrato un fenomeno di anticipazione dell'esordio clinico. Il lavoro è stato pubblicato sul *Journal of Clinical Oncology* (Rumi *et al.*, 2007).

Abbiamo quindi studiato ulteriormente il meccanismo dell'anticipazione dell'esordio clinico delle neoplasie mieloproliferative. Il lavoro è stato pubblicato *Blood* (Rumi *et al.*, 2008).

In uno studio collaborativo abbiamo dimostrato che l'aplotipo GGCC di JAK2 comporta un rischio più alto di acquisire mutazioni dell'esone 12 di JAK2. Tale lavoro è stato pubblicato su *Leukemia* (Olcaydu *et al.*, 2009).

2. *Mutazioni dell'esone 12 di JAK2 nelle neoplasie mieloproliferative: una nuova base molecolare di eritrocitosi*

In pazienti affetti neoplasia mieloproliferativa negativi per la mutazione JAK2 (V617F) – che si trova nell'esone 14 – abbiamo sequenziato l'esone 12 del gene. Abbiamo trovato

diverse mutazioni – principalmente delezioni di 6 basi – che si trovano esclusivamente in pazienti affetti da policitemia vera o da eritrocitosi idiopatica, e la maggior parte dei pazienti affetti da policitemia vera portatori di tali mutazioni hanno una isolata eritrocitosi con valori bassi di eritropoietina sierica. Pertanto le mutazioni somatiche dell'esone 12 di JAK2 sembrano comportare una selettiva espansione dell'eritropoiesi.

L'identificazione delle mutazioni dell'esone 12 di JAK2 ha anche consentito di validare la nozione di predisposizione genetica all'acquisizione di mutazioni responsabili della patogenesi delle neoplasie mieloproliferative. In due famiglie abbiamo infatti trovato 2 fratelli e 2 sorelle affetti da policitemia vera: uno dei due (o una delle due) aveva la mutazione classica JAK2 (V617F), mentre l'altro (o l'altra) aveva una mutazione dell'esone 12. Questo aveva anche un impatto sul fenotipo, in quanto i pazienti con la mutazione JAK2 (V617F) avevano una classica policitemia vera, mentre quelli con la mutazione dell'esone 12 avevano una neoplasia mieloproliferativa essenzialmente eritrocitica.

Questo lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Pietra *et al.*, 2008).

3. *Asse CXCR4/SDF-1 nella mielofibrosi idiopatica*

L'asse CXCR4/SDF-1, che determina il legame delle cellule staminali emopoietiche al microambiente midollare e le cui alterazioni possono essere responsabili di abnorme mobilizzazione di tali cellule, è stato studiato nel topo *Gata1^{low}*, che rappresenta un modello murino di mielofibrosi primaria. Tanto nel topo *Gata1^{low}* che nei pazienti affetti da mielofibrosi primaria i livelli sierici di SDF-1 sono risultati elevati; inoltre la proteina SDF-1 tendeva ad aumentare nel midollo osseo. Queste osservazioni suggeriscono che tali anomalie dell'asse CXCR4/SDF-1 sono responsabili dell'abnorme ricircolo di cellule staminali presente sia nei pazienti sia nel modello murino di mielofibrosi primaria. Tale lavoro è stato pubblicato su *Experimental Hematology* (Migliaccio *et al.*, 2008).

Uno studio successivo ha dimostrato che l'ipermetilazione del promoter di CXCR4 può essere responsabile di ridotta espressione del gene nei pazienti affetti da mielofibrosi primaria, e può pertanto contribuire all'abnorme ricircolo di cellule staminali CD34-positivo che caratterizza tale condizione morbosa. Tale lavoro è stato pubblicato su *Stem Cells* (Bogani C *et al.*, 2008).

3. *Rilevanza clinica del carico mutazionale JAK2 (V617F) nella policitemia vera e sviluppo di un modello prognostico dinamico per predire l'aspettativa di vita nei pazienti affetti da mielofibrosi post-policitemia*

In uno studio osservazionale prospettico, abbiamo valutato 338 pazienti affetti da policitemia vera: 320 (94,7%) erano positivi per la mutazione JAK2 (V617F), 14 (4,1%) erano positivi per mutazioni dell'esone 12 di JAK2, mentre i rimanenti 4 pazienti non avevano le suddette mutazioni. In analisi multivariata, un alto carico mutazionale JAK2 (V617F) (più del 50% di alleli mutanti nei granulociti circolanti) rappresentava un fattore di rischio indipendente per la progressione verso la mielofibrosi post-policitemia vera. Tale lavoro verrà presentato come comunicazione orale al 51° Meeting dell'American Society of Hematology, New Orleans, 5-8 December 2009 [Relationship between granulocyte JAK2 (V617F) mutant allele burden and risk of progression to myelofibrosis in polycythemia vera: a prospective study of 338 patients].

In una serie di pazienti affetti da policitemia vera abbiamo trovato che la leucocitosi alla diagnosi rappresenta un fattore di rischio di evoluzione in mielofibrosi. La sopravvivenza mediana dei 68 pazienti con mielofibrosi post-policitemia vera è stata di 5,7 anni. Utilizzando un modello di Cox basato su analisi multivariata e covariate tempo-dipendenti,

abbiamo definito uno sistema di scoring utile per prevedere la sopravvivenza del singolo paziente. I tre fattori di rischio indipendenti sono risultati: emoglobina inferiore a 10 g/dL, piastrine inferiori a $100 \times 10^9/L$, e leucociti superiori a $30 \times 10^9/L$. Questo lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Passamonti *et al.*, 2008).

4. *Storia naturale della trombocitemia essenziale e rilevanza clinica dello stato mutazionale di JAK2 e di MPL*

Uno studio condotto su una coorte di 605 pazienti affetti da trombocitemia essenziale ha dimostrato che il rischio di trombosi è pari al 14% a 10 anni, e aumenta fino al 30% a 20 anni dalla diagnosi. Per conto il rischio di evoluzione in mielofibrosi e quello di evoluzione in leucemia acuta sono pari al 2,8% e al 2,6%, rispettivamente, a 10 anni. Questo lavoro è stato pubblicato su *Haematologica* (Passamonti *et al.*, 2008).

In uno studio condotto su 994 pazienti affetti da trombocitemia essenziale, 30 sono risultati positivi per la mutazione MPL (W515L/K). Tali pazienti avevano valori più bassi di emoglobina e valori più alti di piastrine rispetto ai pazienti con la mutazione classica JAK2 (V617F). Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Vannucchi *et al.*, 2008).

Lo stato mutazionale di JAK2 non è risultato correlato con il fenotipo clinico e la prognosi nella mielofibrosi post-policitemia (Guglielmelli *et al.*, 2009).

5. *Rilevanza del carico mutazionale JAK2 (V617F) nella mielofibrosi primaria*

Un primo studio condotto su 304 pazienti affetti da mielofibrosi primaria ha dimostrato che la mutazione JAK2 (V617F) era presente nel 63% dei casi. La mutazione era omozigote in una parte dei pazienti e tale stato molecolare si associava ad importante splenomegalia, leucocitosi e necessità di trattamento citoreducente. La positività per JAK2 (V617F) comportava inoltre un maggior rischio di evoluzione in leucemia acuta. Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Barosi *et al.*, 2007).

In uno studio condotto su 186 pazienti affetti da mielofibrosi primaria, si è dimostrato che un basso carico mutazionale JAK2 (V617F) può rappresentare un fattore prognostico negativo in quanto si associa ad un fenotipo clinico mielodepleto, che tende a sviluppare rapidamente importante anemia senza una marcata splenomegalia e che comporta ridotta sopravvivenza. Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Guglielmelli *et al.*, 2009).

6. *Partecipazione a trial clinici riguardanti terapie innovative delle neoplasie mieloproliferative*

I ricercatori clinici delle Unità Operative del Prof. Mario Cazzola e del Dott. Giovanni Barosi stanno attualmente partecipando a trial clinici riguardanti terapie innovative delle neoplasie mieloproliferative.

Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo secondo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Bacigalupo A, Pecci A, Viarengo G, Zuffardi O, Frassoni F, Barosi G. Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. *Blood* 2009;114(14):3127-30.
2. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA)

- Italian Registry of Myelofibrosis. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;110(12):4030-6.
3. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Kiladjian JJ, Lengfelder E, McMullin MF, Passamonti F, Reilly JT, Vannucchi AM, Barbui T. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* 2009;113(20):4829-33.
 4. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, Dupriez B, Levine RL, Passamonti F, Gotlib J, Reilly JT, Vannucchi AM, Hanson CA, Solberg LA, Orazi A, Tefferi A; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* 2008;22(2):437-8.
 5. Bergamaschi GM, Primignani M, Barosi G, Fabris FM, Villani L, Reati R, Dell'era A, Mannucci PM. MPL and JAK2 exon 12 mutations in patients with the Budd-Chiari syndrome or extrahepatic portal vein obstruction. *Blood* 2008;111(8):4418.
 6. Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, Desterke C, Rosti V, Bosi A, Le Bousse-Kerdilès MC, Barosi G, Vannucchi AM; Myeloproliferative Disorders Research Consortium. Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells* 2008;26(8):1920-30.
 7. Boveri E, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Arcaini L, Pascutto C, Castello A, Cazzola M, Magrini U, Lazzarino M. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br J Haematol* 2008;140(2):162-8.
 8. Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007;92(12):1585-9.
 9. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22(5):905-14.
 10. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, Passamonti F, Invernizzi R, Castello A, Magrini U, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009;27(5):754-62.
 11. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L, Antonioli E, Bosi A, Vannucchi AM. JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Haematologica* 2009;94(1):144-6.
 12. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi A, Lo Coco F, Antonioli E, Pieri L, Pancrazzi A, Ponziani V, Delaini F, Longo G, Ammatuna E, Liso V, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* 2009;114(8):1477-83.
 13. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Galli A, Travaglino E, Brisci A, Rumi E, Passamonti F, Invernizzi R, Cremonesi L, Boulwood J, Wainscoat JS, Hellström-Lindberg E, Cazzola M. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood* 2009;114(17):3538-45.
 14. Martelli F, Ghinassi B, Lorenzini R, Vannucchi AM, Rana RA, Nishikawa M, Partamian S, Migliaccio G, Migliaccio AR. Thrombopoietin inhibits murine mast cell differentiation. *Stem Cells* 2008;26(4):912-9.
 15. Migliaccio AR, Martelli F, Verrucci M, Migliaccio G, Vannucchi AM, Ni H, Xu M, Jiang Y, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Hoffman R. Altered SDF-1/CXCR4 axis in patients with

- primary myelofibrosis and in the Gata1 low mouse model of the disease. *Exp Hematol* 2008;36(2):158-71.
16. Mutschler M, Magin AS, Buerge M, Roelz R, Schanne DH, Will B, Pilz IH, Migliaccio AR, Pahl HL. NF-E2 overexpression delays erythroid maturation and increases erythrocyte production. *Br J Haematol* 2009;146(2):203-17.
 17. Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D, Passamonti F, Lippert E, Carillo S, Girodon F, Vannucchi A, Reading NS, Prchal JT, Ay C, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia* 2009;23(10):1924-6.
 18. Pancrazzi A, Guglielmelli P, Ponziani V, Bergamaschi G, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM. A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in chronic myeloproliferative disorders with locked nucleic acid-modified probes and real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2008;10(5):435-41.
 19. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, Boggi S, Astori C, Bernasconi P, Varettoni M, Brusamolino E, Pascutto C, Lazzarino M. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica* 2008;93(11):1645-51.
 20. Passamonti F, Rumi E, Caramella M, Elena C, Arcaini L, Boveri E, Del Curto C, Pietra D, Vanelli L, Bernasconi P, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. *Blood* 2008;111(7):3383-7.
 21. Piaggio G, Rosti V, Corselli M, Bertolotti F, Bergamaschi G, Pozzi S, Imperiale D, Chiavarina B, Bonetti E, Novara F, Sessarego M, Villani L, Garuti A, Massa M, Ghio R, Campanelli R, Bacigalupo A, Pecci A, Viarengo G, Zuffardi O, Frassoni F, Barosi G. Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. *Blood* 2009;114(14):3127-30.
 22. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111(3):1686-9.
 23. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, Del Curto C, Pietra D, Boveri E, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007;25(35):5630-5.
 24. Rumi E, Passamonti F, Pagano L, Ammirabile M, Arcaini L, Elena C, Flagiello A, Tedesco R, Vercellati C, Marcello AP, Pietra D, Moratti R, Cazzola M, Lazzarino M. Blood p50 evaluation enhances diagnostic definition of isolated erythrocytosis. *J Intern Med* 2009;265(2):266-74.
 25. Rumi E, Passamonti F, Picone C, Della Porta MG, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Disease anticipation in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2008;112(6):2587-8.
 26. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112(3):844-7.