

MIELOFIBROSI COME MODELLO PER LO STUDIO DEL RUOLO DEL MICROAMBIENTE NELLO SVILUPPO DELLE LEUCEMIE

Lilian Varricchio (a), Fabrizio Martelli (b), Fiorella Ciaffoni (c), Emanuela D'Amore (d), Anna Rita Migliaccio (b)

(a) Tisch Cancer Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA

(b) Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(d) Servizio biologico e per la gestione della sperimentazione animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La Mielofibrosi Primaria (PMF) appartiene alla categoria delle neoplasie mieloproliferative croniche *Philadelphia-negative* (1). La malattia si manifesta con una varietà di alterazioni, che includono anemia, splenomegalia e proliferazione clonale di progenitori emopoietici in tessuti extramidollari e può evolvere in leucemia (2-4). È una malattia causata dall'interazione anormale tra un clone di cellule staminali ematopoietiche e il microambiente. La PMF, infatti, è caratterizzata dalla proliferazione abnorme di megacariociti, una popolazione cellulare responsabile non solo della produzione di piastrine ma anche di regolare la funzione delle cellule stromali, e da fibrosi midollare di natura reattiva con conseguente eritropoiesi inefficace nel midollo. Queste due caratteristiche vengono usate per monitorare la progressione della malattia.

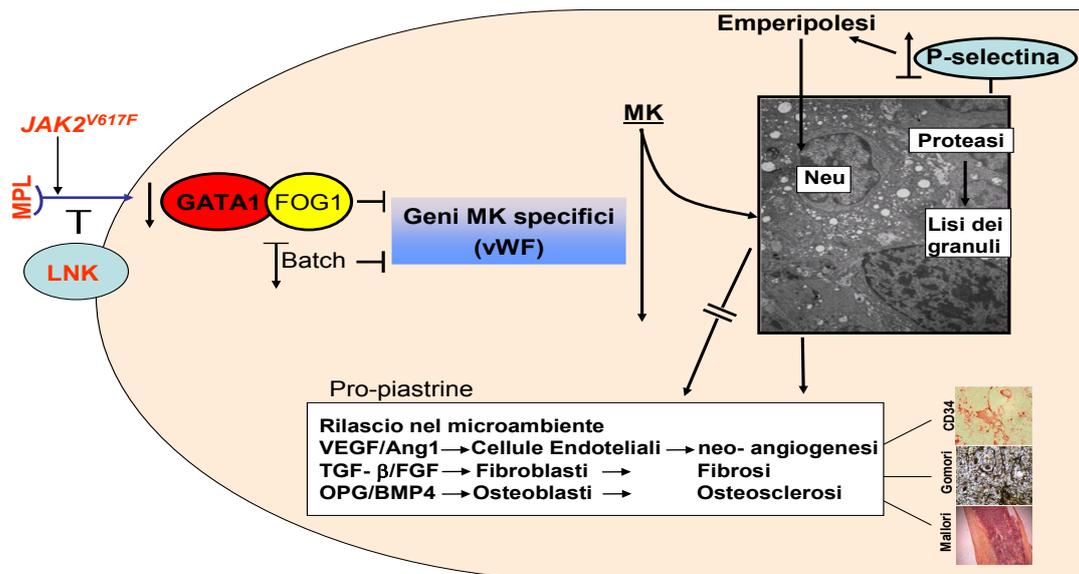
Come le altre neoplasie mieloproliferative *Philadelphia-negative*, la PMF può essere associata con la mutazione somatica V617F nel gene *Janus Kinase 2 (JAK2)* che impedisce al dominio con attività tirosin-chinasica della proteina di disattivarsi (1). Tuttavia, al contrario delle altre neoplasie mieloproliferative in cui la mutazione è presente con frequenza >80%, nei pazienti con PMF la mutazione *JAK2V617F* è presente con una frequenza <50%. Altre mutazioni identificate in una minoranza dei pazienti con PMF sono rappresentate dalla mutazione *JAK2T875N*, che attiva un altro dominio della proteina, e mutazioni che attivano costitutivamente MPL, il recettore per la trombopoietina (TPO), (*MPLW515L* e *MPLW515K*)¹. Comunque, le mutazioni identificate fino ad ora non sembrano rappresentare la lesione genica primaria ma mutazioni che si verificano durante stadi intermedi di una complessa sequenza di eventi che coinvolge molteplici mutazioni genetiche che si susseguono durante la progressione della malattia (1). Per questo motivo, il paradigma terapeutico che ha avuto tanto successo nelle neoplasie mieloproliferative *Philadelphia-positive* (trattamenti con farmaci che inibiscono l'attività chinasica dell'oncogene Bcr-Abl (5, 6) attivato in queste patologie) sta dando scarsi risultati nella PMF. Infatti, i risultati clinici delle sperimentazioni cliniche con farmaci che inibiscono JAK2 direttamente (*INCB018424*, *XL019* and *TG101348*) oppure con effetto off-target (*MKS-0457*, *CEP-701*, *AT9283*) sperimentate in pazienti con PMF fino ad ora sono stati modesti (per una rassegna vedi (7)). L'unica terapia possibile per la PMF rimane ancora il trapianto allogenico di cellule staminali, una procedura che può essere offerta solo a quella minoranza di pazienti che hanno un donatore compatibile e che è associata ad alta tossicità (8). Lo sviluppo di approcci terapeutici alternativi e più sicuri per questa malattia resta quindi una priorità.

Queste considerazioni mettono in risalto l'importanza di studi in modelli animali per capire meglio la pato-biologia della malattia e per identificare ulteriori target contro cui sviluppare farmaci più efficaci per curare questi pazienti (9).

Stato dello sviluppo

JAK2 è il primo elemento di trasduzione del segnale di numerose citochine ematopoietiche, inclusa la TPO, il fattore di crescita che controlla la maturazione megacariocitaria (10). La relazione tra la mutazione *JAK2V617F* e lo sviluppo di fibrosi midollare nei pazienti con PMF è oggetto di numerosi studi. Un'ipotesi è che la fibrosi sia una conseguenza dell'attivazione dei fibroblasti midollari da parte dei megacariociti anomali generati in seguito alla presenza della mutazione. Infatti, i megacariociti che si sviluppano nei pazienti con PMF sono caratterizzati da un'"impronta patologica" che include sia alterazioni biochimiche (ridotti livelli di espressione del fattore di trascrizione GATA1 e di geni megacariociti-specifici tra cui il fattore von Willebrand e aumentata espressione della P-selectina, un recettore riconosciuto dai neutrofilii, nella regione di demarcazione della membrana) e morfologiche (emperipolesi dei neutrofilii e morte per para-apoptosi) (11).

Il ruolo centrale delle anomalie dei megacariociti nello sviluppo della PMF è dimostrato dal fatto che qualunque mutazione che induce nel topo anomalie dello sviluppo dei megacariociti simili a quelle identificate nella PMF, induce anche sviluppo di mielofibrosi (11). Questi modelli animali includono, oltre che topi portatori della mutazione *JAK2V617F* (9), mutazioni che interferiscono con il controllo estrinseco (mutazioni positive nella TPO e nel suo recettore MPL, topi TPO^{high}) (12-14) della megacariocitopoiesi o con il suo controllo intrinseco (mutazioni ipomorfiche nel fattore di trascrizione GATA1, topi Gata1^{low}) (15) (Figura 1).



Legenda: MK: Megacariocita; MPL: recettore per la trombopoietina; TPO: Trombopoietina; vWF: von Willebrand factor

Figura 1. Modello patobiologico della PMF che identifica un *pathway* che riunisce tutte le mutazioni descritte in modelli murini che sviluppano mielofibrosi

Nella Figura 1 le mutazioni identificate anche nei pazienti sono indicate in rosso. Mutazioni che attivano il *pathway* del segnale della trombopoietina (TPO^{high}) o riducono l'espressione di Gata1 (Gata1^{low}), rispettivamente il fattore di crescita e quello di trascrizione che controllano la megacariocitopoiesi, inducono anomalie megacariocitarie simili a quelle osservate in PMF. La

conseguenza maggiore di queste anomalie è la delocalizzazione della P-selectina, il recettore per i neutrofili, sul sistema di demarcazione delle membrane. Questa delocalizzazione induce un processo anormale di emperipolesi dei neutrofili che uccide i megacariociti per para-apoptosi con conseguente rilascio dei fattori di crescita presenti nei loro granuli nel microambiente.

Lo sviluppo di modelli animali svolge un ruolo determinante nello studio della patologia e nell'identificazione di possibili terapie in molte patologie. Nel caso della PMF, ciascuno dei modelli animali sviluppati fino ad ora ha avuto una sua applicazione specifica.

I modelli generati introducendo nei topi mutazioni presenti nei pazienti, quali *JAK2V617F*, sono particolarmente indicati per studi preclinici per l'identificazione di farmaci che possano curare la PMF attraverso l'inibizione dell'attività biologica di questo enzima (9). Sfortunatamente, queste terapie applicabili solo in quei casi che presentano la mutazione *JAK2V617F*, hanno avuto fino ad ora risultati modesti (7).

Modelli che generano la malattia rapidamente, quali i mutanti TPO^{high} (12-14), sono invece utili per studi di complementazione genica che hanno lo scopo di identificare elementi a monte e a valle della mutazione che possono contribuire allo sviluppo della malattia. Il contributo più importante dato da questo modello è stato l'aver identificato il ruolo fondamentale svolto dal TGF- β nella patogenesi della malattia (16).

Topi portatori della mutazione ipomorfa *Gata1^{low}* che comporta una ridotta espressione di questo fattore di trascrizione essenziale per la maturazione megacariocitaria, sviluppano invece la malattia in fasi sequenziali ben definite nell'arco di due anni (17). Per questo motivo, questi modelli animali hanno rappresentato un ruolo essenziale nel definire la relazione gerarchica tra i vari eventi patologici che si manifestano durante la progressione della malattia e nel definire strategie di cura indirizzate per ciascuna di queste fasi.

Uno dei contributi più importanti forniti dal modello *Gata1^{low}* è stato chiarire la patobiologia dell'aumento del traffico delle cellule staminali/progenitrici ematopoietiche tra il midollo e i siti extra-midollari, quali milza e fegato. Dati ottenuti nel modello *Gata1^{low}* e confermati da studi successivi in pazienti con PMF, indicano che questa complessa caratteristica è probabilmente determinata sia da difetti intrinseci della cellula staminale (ridotta espressione del recettore di adesione CXCR4) (18-20) che da difetti del microambiente (alterati livelli quantitativi e qualitativi di citochine nel microambiente come conseguenza delle anomalie megacariocitiche) (18, 21). Questo concetto, elaborato nel corso di diversi anni nella PMF è simile al recente concetto di "nicchia promuovente la trasformazione neoplastica" (*cancer activating niche*) recentemente teorizzato da Robert Weinberg per i tumori solidi (22). Infatti, per spiegare l'eterogeneità della progressione metastatica nei tumori solidi, Robert Weinberg ha sviluppato il concetto che le cellule tumorali sono in grado di alterare il loro microambiente in modo da crearne uno che supporti la progressione tumorale. Questo modello indica che nel caso della PMF, la progenie megacariocitaria delle staminali pre-neoplastiche PMF è responsabile, tramite rilascio di TGF- β , di attivare i fibroblasti midollari che, secernendo fibre di collagene, formano un microambiente fibrotico non-permissivo alla maturazione delle cellule staminali emopoietiche nel midollo. La ridotta espressione di CXCR4, dovuta probabilmente a modificazioni epigenetiche del gene conseguenza della lesione genica primaria della malattia (19), mobilita in circolo le cellule staminali/progenitrici emopoietiche pre-PMF. Una volta in circolo, queste cellule colonizzano i siti extramidollari dove trovano un milieu che ne favorisce la proliferazione e la trasformazione in cellule staminali emopoietiche PMF, iniziando la fase patogenetica vera e propria della malattia. Le condizioni di stress (ridotto pO_2) che si instaurano nel microambiente in seguito all'anemia dovuta all'eritropoiesi inefficace nel midollo, modificano poi ulteriormente il microambiente dei siti extramidollari selezionando quei cloni PMF che hanno sviluppato ulteriori mutazioni iniziando il processo leucemogenico. Questo modello sviluppato con chiarezza per la PMF, è però applicabile anche ad altre forme di leucemie fornendo un quadro di lettura unitario tra lo sviluppo dei tumori ematopoietici e di quelli solidi.

La mielofibrosi nel modello murino $Gata1^{low}$

Il gene *Gata1* è stato identificato mediante screening per geni espressi in modo differenziale tra cellule eritroleucemiche indotte o non indotte alla maturazione eritroide mediante trattamento con dimetilsolfossido (23). Esso è localizzato sia nei topi che negli uomini sul cromosoma X e codifica per un fattore di trascrizione necessario per lo sviluppo delle cellule ematopoietiche di molti stipiti tra cui, oltre ai megacariociti menzionati precedentemente, quelle eritroidi, mastocitari, eosinofili e dendritici (24-26). La proteina GATA1 esercita le sue funzioni trascrizionali legandosi, in combinazione con altri fattori di trascrizione/proteine regolatrici, alle regioni che regolano l'espressione di molti geni eritroidi specifici, inclusi il recettore per il fattore di crescita eritropoietina e lo stesso gene *GATA1* (27). Il ruolo fondamentale svolto da questo fattore di crescita nella maturazione eritroide è dimostrato dall'osservazione che la sua delezione nei topi è letale allo stato embrionale a causa di una profonda anemia (28).

GATA1 appartiene ad una famiglia di fattori trascrizionali caratterizzata da due regioni *zinc finger* che presentano un'architettura ben conservata che assicura una parziale ridondanza tra le funzioni dei vari membri (27). È stato dimostrato che la funzione specifica dei membri di questa famiglia non è assicurata mediante specificità funzionali struttura-specifica ma da un accurato meccanismo di regolazione dell'espressione dei vari geni GATA durante la maturazione delle singole linee emopoietiche (29). Il *Gata1* locus, per esempio, contiene due primi esoni non tradotti: l'esone prossimale, usato principalmente dalle cellule eritroidi e megacariocitiche e l'esone distale identificato per la prima volta perché usato dalle cellule del Sertoli del testicolo per iniziare la trascrizione (30). Questi due esoni sono preceduti rispettivamente da due promotori identificati come IE (promotore eritroide) ed IT (promotore del testicolo). Le mutazioni ipomorfe $Gata1^{-0.5}$ e $Gata1^{low}$ (anche definita $Gata1^{neo\delta HS}$) sono due delezioni che sostituiscono regioni 10-8 kb a monte di IE che includono il sito del promotore IT e il primo sito di ipersensibilità alla DNaseI (HS1) con una cassette neomicina-resistente (31, 32). Entrambe queste mutazioni sono letali a causa di trombocitopenia e di anemia nel genotipo C57BL/6. Alcuni dei mutanti $Gata1^{-0.5}$ sopravvivono alla nascita ma sviluppano leucemia nei primi 3-6 mesi di vita.

Mentre nel ceppo C57BL, i topi $Gata1^{low}$ muoiono alla nascita per le conseguenze dell'anemia, in ceppi capaci di attivare rapidamente l'ematopoiesi in siti extramidollari (CD1 o DBA2) i mutanti $Gata1^{low}$ sono vitali in età adulta perché recuperano dall'anemia ad un mese di età pur rimanendo trombocitopenici per tutta la vita (17). L'anemia è dovuta a un incremento del processo apoptotico negli eritroblasti, legato alla bassa espressione di GATA1 (~ il 20% di livelli di espressione *wild-type*) (31). L'induzione dell'eritropoiesi nella milza è sufficiente a compensare l'aumentata eritropoiesi inefficace conseguenza della mutazione (33). Anche la trombocitopenia è causata dai ridotti livelli di proteina GATA1 nei megacariociti (34, 3). Queste cellule però rimangono immature, e le poche piastrine rilasciate da queste cellule contengono una quantità ridotta di granuli (35, 36). Nel ceppo CD1, però, i mutanti $Gata1^{low}$ sviluppano nel tempo tutte le caratteristiche patologiche riportate nei pazienti con PMF. Queste includono: 1) da uno a sei mesi: ematopoiesi nella milza, osteosclerosi, trombosi in tessuti multipli e piastrinopenia (stadio pre-PMF); 2) da 6 a 10 mesi: neo-angionesi e fibrosi midollare (stadio PMF); 3) da 10 mesi alla morte dell'animale: fibrosi nel midollo e nella milza, aumentato numero di cellule staminali e progenitrici in circolo e sviluppo dell'ematopoiesi nel fegato (11). Nel ceppo DBA/2 la mutazione induce una leggera mielofibrosi, mentre una simile mutazione in topi BALB/C induce trombocitopenia e osteoporosi, ma non mielofibrosi e i topi muoiono di leucemia megacariocitica in tarda età (Donald Metcalf, comunicazione personale). La diversa penetranza della mielofibrosi indotta dalla mutazione ipomorfa $Gata1^{low}$ nei diversi ceppi murini suggerisce l'esistenza di geni modificatori che cooperano con la mutazione ipomorfa

nel determinarne il fenotipo. L'osservazione che la severità del fenotipo è inversamente correlata con la capacità di reclutare la milza come sito eritropoietico durante il recupero dell'anemia emolitica indotta dalla fenilidrazina (37, 38), suggerisce che almeno uno di questi geni modificatori è rappresentato da sf-Stk, un gene la cui espressione è regolata da GATA1 e che svolge un'azione determinante nel recupero dall'anemia da stress nel topo. Questi risultati hanno fornito una chiave di lettura all'estrema variabilità nel decorso clinico della PMF nell'uomo.

I megacariociti Gata1^{low} e quelli dei pazienti con PMF presentano le stesse anomalie di maturazione

La trombocitopenia, con un numero di piastrine al 30% del valore fisiologico, permane per tutta la durata della vita nei topi Gata1^{low} (11). Essa è associata con l'iperproliferazione dei megacariociti e con una ritardata maturazione sia nel midollo osseo che nella milza. Come nei pazienti PMF, i megacariociti dei topi GATA1^{low} risultano iperplastici e immaturi con una alterata struttura dei β -granuli, bassa o non rilevabile espressione del fattore von Willebrand, e altre importanti proteine megacariocitarie (36, 39). Fa eccezione la P-selectina che è espressa a livelli normali ma si localizza principalmente nella zona di demarcazione delle membrane a contatto con l'esterno della cellula (Figura 1). Questa localizzazione favorisce una emperipolesi anormale dei megacariociti con i neutrofili (36, 39). L'emperipolesi è il passaggio di una cellula attraverso un'altra cellula e lascia generalmente le due cellule intatte. I megacariociti, sia per la loro dimensione, sono 10-50 volte più grandi delle altre cellule, che per il citoplasma altamente canalizzato dal sistema di demarcazione delle membrane, si prestano particolarmente ad essere attraversati da altre cellule in particolare dai neutrofili. A causa dell'alta concentrazione di P-selectina sul sistema delle membrane, però, l'emperipolesi tra i neutrofili e i megacariociti Gata1^{low} coinvolge la fusione tra le due cellule con conseguente riversamento delle proteasi dei neutrofili nel citoplasma dei megacariociti. Queste proteasi degradano i megacariociti inducendone la morte per para-apoptosi e il rilascio delle citochine presenti nel loro microambiente citoplasmatico (Figura 1). Queste citochine promuovono poi l'osteosclerosi, l'angiogenesi e la fibrosi portando ad una degenerazione generale del microambiente midollare. Queste osservazioni hanno portato all'ipotesi che la mielofibrosi possa essere curata mediante trattamenti con inibitori delle citochine rilasciate dai megacariociti in questo processo di peripolesi. Questa ipotesi è stata testata dimostrando che trattamenti con una sostanza naturale (l'Aplidina) che inibisce il *pathway* del VEGF, uno dei fattori di crescita rilasciati dai megacariociti, curano la mielofibrosi nei topi Gata1^{low} (40). La valutazione di questo farmaco nei pazienti è stata però sospesa in quanto i risultati sono stati modesti. Comunque questo studio nei topi Gata1^{low} è rimasto una "prova di principio" e sono in corso altri studi che usando questo modello valuteranno la capacità di inibitori di altre citochine per curare la fibrosi nel modello animale.

Conclusioni e prospettive future

Lo sviluppo regolare dell'ematopoiesi è rigorosamente controllato mediante appropriate interazioni tra le cellule staminali/progenitrici emopoietiche e le loro nicchie nel microambiente midollare (41). Studi recenti che coinvolgono saggi quantitativi delle funzioni delle cellule

staminali emopoietiche in mutanti difettivi per le interazioni di queste cellule con il microambiente, stanno chiarendo la natura di queste interazioni in modelli animali (42). Molto lavoro resta ancora da fare per convalidare queste scoperte nell'uomo dove i modelli sperimentali sono ovviamente più limitati perché motivi etici proibiscono l'induzione di mutazioni specifiche. Queste mutazioni però, possono avvenire nell'uomo spontaneamente durante l'insorgenza di malattie che divengono quindi modelli di studio per comprendere determinati meccanismi biologici nell'uomo. In questo senso, la PMF, una malattia nella quale le interazioni tra le cellule staminali e le loro nicchie nel midollo sono distrutte, rappresenta un modello di studio fondamentale per capire le interazioni tra cellule staminali emopoietiche e il microambiente del midollo nell'uomo.

Nonostante le numerose importanti scoperte fatte negli ultimi anni sulla patologia della PMF, il difetto molecolare primario che porta allo sviluppo di questa malattia è ancora oscuro in quasi la metà dei pazienti. Inoltre, il trapianto allogenico delle cellule staminali resta la sola terapia curativa per questi pazienti. Dal momento che non tutti i pazienti hanno un donatore compatibile che li rende eleggibili per questo trattamento, lo sviluppo di approcci terapeutici alternativi per questa malattia rimane una priorità. Per raggiungere l'obiettivo finale di curare la PMF, sono stati generati molti modelli animali della malattia. Sebbene mutazioni del gene GATA1 non siano state ancora scoperte in pazienti con PMF, i megacariociti di questi pazienti sono caratterizzati da tutte le anomalie indotte nel topo da mutazioni ipomorfiche di GATA1. Queste analogie rendono i topi *Gata1^{low}* uno strumento inestimabile per la comprensione del meccanismo che è alla base non solo dello sviluppo della fibrosi ma soprattutto del traffico anormale delle cellule staminali ematopoietiche e dello sviluppo di ematopoiesi inefficace nel midollo e di ematopoiesi in siti extramidollari. Riassumendo, il collegamento cruciale tra anomalie nei megacariociti, alterazioni del microambiente e sviluppo della PMF scoperto grazie ai modelli murini della malattia, suggerisce che farmaci che ripristino la maturazione dei megacariociti possano rappresentare una valida alternativa di cura per questi pazienti. I modelli animali della malattia, incluso il modello murino *Gata1^{low}* svolgeranno un ruolo fondamentale nella validazione di questa ipotesi.

Finanziamenti

Passati: Program Project del National Cancer Institute (USA) P01-CA108671-01A1 al Mount Sinai School of Medicine - New York - NY - USA (2006-2011) e fondi del Ministero della Salute nell'ambito del progetto Alleanza sul Cancro all'Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia (2007-2010).

Correnti: Program Project del National Cancer Institute (USA) P01-CA108671-01A2 al Mount Sinai School of Medicine - New York - NY - USA (2006-2011) e Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (2011-2013) e Progetto Italia-USA (2010-2012) dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma - Italia.

Bibliografia

1. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118:1723-35.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372-5.

3. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14-22.
4. Barosi G, Hoffman R. Idiopathic myelofibrosis. *Semin Hematol* 2005;42:248-58.
5. Van Etten RA, Koschmieder S, Delhommeau F, *et al.* The Ph-positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical and clinical issues. *Haematologica* 2011;96:590-601.
6. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 2008;112:4808-17.
7. Pardanani A, Tefferi A. *Targeting* myeloproliferative neoplasms with JAK inhibitors. *Curr Opin Hematol* 2011;18:105-10.
8. Cervantes F, Mesa R, Barosi G. New and old treatment modalities in primary myelofibrosis. *Cancer J* 2007;13:377-83.
9. Li J, Kent DG, Chen E, Green AR. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Dis Model Mech* 2011;4:311-17.
10. Kaushansky K. Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling. *J Thromb Haemost* 2009;7(1):235-38.
11. Varricchio L, Mancini A, Migliaccio AR. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis. *Expert Rev Hematol* 2009;2:315-34.
12. Ohwada A, Rafii S, Moore MA, Crystal RG. *In vivo* adenovirus vector-mediated transfer of the human thrombopoietin cDNA maintains platelet levels during radiation-and chemotherapy-induced bone marrow suppression. *Blood* 1996;88:778-84.
13. Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, *et al.* High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 1997;90:4369-83.
14. Yan XQ, Lacey D, Fletcher F, *et al.* Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. *Blood* 1995;86:4025-33.
15. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, *et al.* Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood* 2002;100:1123-32.
16. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendling F. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 2002;100:3495-3503.
17. Martelli F, Ghinassi B, Panetta B, *et al.* Variegation of the phenotype induced by the Gata1 low mutation in mice of different genetic backgrounds. *Blood* 2005;106:4102-13.
18. Migliaccio AR, Martelli F, Verrucci M, *et al.* Altered SDF-1/CXCR4 axis in patients with primary myelofibrosis and in the Gata1 low mouse model of the disease. *Exp Hematol* 2008;36:158-71.
19. Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, *et al.* Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells* 2008;26:1920-30.
20. Shi J, Zhao Y, Ishii T, *et al.* Effects of chromatin-modifying agents on CD34+ cells from patients with idiopathic myelofibrosis. *Cancer Res* 2007;67:6417-24.
21. Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Charpentier A, *et al.* Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood* 1996;88:4534-46.
22. McAllister SS, Weinberg RA. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. *J Clin Oncol* 2010;28:4022-28.

23. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 1989;339:446-51.
24. Yu C, Cantor AB, Yang H, *et al.* Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage *in vivo*. *J Exp Med* 2002;195:1387-95.
25. Migliaccio AR, Rana RA, Sanchez M, *et al.* GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1low mouse mutant. *J Exp Med* 2003;197:281-296.
26. Kozma GT, Martelli F, Verrucci M *et al.* Dynamic regulation of Gata1 expression during the maturation of conventional dendritic cells. *Exp Hematol* 2010;38:486-503.
27. Cantor AB, Orkin SH. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:513-19.
28. Pevny L, Simon MC, Robertson E, *et al.* Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991;349:257-60.
29. Ferreira R, Wai A, Shimizu R, *et al.* Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. *Blood* 2007;109:5481-90.
30. Kobayashi M, Yamamoto M. Regulation of GATA1 gene expression. *J Biochem* 2007;142:1-10.
31. McDevitt MA, Shivdasani RA, Fujiwara Y, Yang H, Orkin SH. A "knockdown" mutation created by cis-element gene *targeting* reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6781-85.
32. Shimizu R, Kuroha T, Ohneda O, *et al.* Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function. *Mol Cell Biol* 2004;24:10814-825.
33. Migliaccio AR, Martelli F, Verrucci M, *et al.* GATA1 expression driven by the alternative HS2 enhancer in the spleen rescues the hematopoietic failure induced by the hypomorphic GATA1low mutation. *Blood* 2009;114:2107-20.
34. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J* 1997;16:3965-73.
35. Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 1999;93:2867-75.
36. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, *et al.* Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice. *Blood* 2004;104:3573-80.
37. Ghinassi B, Sanchez M, Martelli F, *et al.* The hypomorphic Gata1low mutation alters the proliferation/differentiation potential of the common megakaryocytic-erythroid progenitor. *Blood* 2007;109:1460-71.
38. Persons DA, Paulson RF, Loyd MR, *et al.* Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nat Genet* 1999;23:159-65.
39. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 2000;96:1342-47.
40. Verrucci M, Pancrazzi A, Martelli F, *et al.* CXCR-4-independent rescue of the myeloproliferative defect of the GATA1low myelofibrosis mouse model by Aplidin. *J Cell Physiol* 2010;225:490-99.
41. Lemischka IR, Moore KA. Stem cells: interactive niches. *Nature* 2003;425:778-79.
42. Magnon C, Lucas D, Frenette PS. Trafficking of stem cells. *Methods Mol Biol* 2011;750:3-24.