



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

***Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari***

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE,  
CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: Scienze Geriatriche ed Ematologiche  
CICLO XXVII°

**RUOLO ANTI-APOPTOTICO DELLA  
TIROSIN-CHINASI LYN  
NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A CELLULE B**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

**Supervisore:** Ch.ma Prof.ssa Anna Maria Brunati

**Dottoranda:** Francesca Zonta







# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>I</b>
<b>ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI</b>	<b>V</b>
<b>Codice ad una e tre lettere degli amminoacidi</b>	<b>V</b>
<b>Tirosin-chinasi della famiglia Src</b>	<b>VI</b>
<b>Definizione delle abbreviazioni</b>	<b>VII</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1 - Leucemia Linfatica Cronica a cellule B (LLC-B)</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Eziologia, diagnosi e stadiazione</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Marcatori molecolari della malattia</b>	<b>3</b>
Stato mutazionale delle IgV <sub>H</sub>	<b>3</b>
ZAP70 e CD38	<b>5</b>
Chemochine della famiglia CC	<b>6</b>
<b>1.3 Patogenesi della malattia</b>	<b>6</b>
Origine e natura dei linfociti LLC-B	<b>6</b>
Ruolo ricoperto dal microambiente	<b>8</b>
Trasduzione del segnale mediata dal BCR	<b>10</b>
Lesioni genetiche e citogenetiche	<b>13</b>
<b>1.4 Recenti approcci terapeutici: gli inibitori chinasi</b>	<b>15</b>
<b>2 - Tirosin-chinasi Lyn</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Tirosin-chinasi della famiglia Src (SFK)</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Struttura e regolazione della SFK Lyn</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Ruolo di Lyn nella patogenesi della LLC-B</b>	<b>21</b>
Modulazione delle vie di segnale	<b>22</b>
Disregolazione e delocalizzazione di Lyn	<b>22</b>
<b>3 - Caspasi 8</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Processo apoptotico</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Molteplici ruoli di caspasi 8</b>	<b>29</b>

3.3	Inattivazione di caspasi 8 nel cancro	31
3.4	Caspasi-8 e SFK	32
4	Protein fosfatasi-2A (PP2A)	33
4.1	Serina/treonina protein fosfatasi	33
4.2	Struttura di PP2A	34
4.3	Ruolo fisiologico di PP2A	36
4.4	Regolazione di PP2A	40
	Inibitori e attivatori di PP2A	41
 <b>SCOPO DELLA TESI</b>		 47
 <b>MATERIALI E METODI</b>		 49
1	Materiali	49
1.1	Anticorpi	49
1.2	Prodotti	49
1.3	Pazienti affetti da leucemia linfatica cronica di tipo B	50
2	Metodiche generali	53
2.1	Isolamento dei linfociti da sangue periferico	53
2.2	Purificazione dei linfociti B mediante rosettazione con SRBC	54
2.3	Purificazione dei linfociti B mediante kit RosetteSep	54
2.4	Colture cellulari	56
2.5	Lisato totale e frazionamento subcellulare	56
2.6	Dosaggio proteico	56
2.7	Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS	57
2.8	Western blotting e rivelazione anticorpale	58
2.9	Gel elettroforesi bidimensionale	59
2.10	Analisi bioinformatica	60
2.11	Centrifugazione su gradiente di densità di glicerolo	60
2.12	Immunoprecipitazione	61
2.13	Valutazione dell'apoptosi mediante citofluorimetria	61
2.14	Analisi statistica	62

<b>3 - Metodiche impiegate in Risultati Parte Prima</b>	<b>63</b>
<b>3.1 Trattamento con fosfatasi-<math>\lambda</math></b>	<b>63</b>
<b>3.2 Saggio di attività di caspasi 8</b>	<b>63</b>
<b>3.3 Purificazione di caspasi 8 da cellule LLC-B</b>	<b>63</b>
<b>3.4 Saggio di fosforilazione di caspasi 8</b>	<b>64</b>
<b>3.5 Silenziamento genico</b>	<b>64</b>
<b>4 - Metodiche impiegate in Risultati Parte Seconda</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Saggio di attività di PP2A</b>	<b>65</b>
<b>4.2 Sintesi degli analoghi di fingolimod</b>	<b>65</b>
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>66</b>
<b>1 - Fosforilazione tirosinica del proteoma citosolico nelle cellule LLC-B</b>	<b>66</b>
<b>2 - Ricerca dei potenziali substrati citosolici di Lyn mediante analisi 2D-PAGE e approccio bioinformatico</b>	<b>67</b>
<b>PARTE PRIMA</b>	<b>68</b>
<b>1 - Procaspasi 8 è ugualmente espressa e inibita nelle cellule UM-LLC e M-LLC</b>	<b>70</b>
<b>2 - La fosforilazione sul residuo Tyr380 è necessaria all'assemblaggio del dimero inattivo di procaspasi 8</b>	<b>73</b>
<b>3 - L'inibizione di caspasi 8 dovuta alla fosforilazione da parte di Lyn previene l'apoptosi delle cellule LLC-B</b>	<b>77</b>
<b>4 - Discussione</b>	<b>82</b>
<b>PARTE SECONDA</b>	<b>86</b>
<b>1 - Gli inibitori di SFK determinano una riduzione della fosforilazione Ser/Thr di molecole che sostengono la sopravvivenza delle cellule LLC-B</b>	<b>86</b>
<b>2 - L'inibizione di Serina-Treonina fosfatasi contrasta l'azione degli inibitori SFK</b>	<b>88</b>
<b>3 - PP2A è ugualmente espressa e fosforilata in Tyr307 nelle cellule LLC-B</b>	<b>90</b>
<b>4 - Nelle cellule LLC-B PP2Ac è fosforilata dalla forma</b>	

citosolica di Lyn	91
<b>5 - Il ruolo della fosforilazione di PP2A in Tyr307     nell'associazione tra PP2A e I2PP2A/SET</b>	<b>93</b>
<b>6 - L'effetto di FTY720 sull'associazione del complesso     PP2A/SET</b>	<b>94</b>
<b>7 - Effetto degli analoghi di FTY720 sulla stabilità del     complesso PP2A/SET</b>	<b>97</b>
<b>8 - Dasatinib potenzia l'effetto pro-apoptotico di MP07-66     in modo sinergico</b>	<b>99</b>
<b>9 - Discussione</b>	<b>101</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA</b>	 <b>105</b>
 <b>APPENDICE</b>	 <b>125</b>

## ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

### Codice ad una e tre lettere degli amminoacidi

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteina
D	Asp	Acido Aspartico
E	Glu	Acido Glutamico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Istidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
X		Aminoacido generico

## **Tirosin-Chinasi della famiglia Src**

SFK = tirosin-chinasi della famiglia Src

Blk = B-lymphoid tyrosine kinase

Fgr = Gardner-Racher feline sarcome

Fyn = Oncogene related to Src, Fgr, Yes

Hck = Hemopoietic cell kinase

Lck = Lymphocyte specific protein tyrosine kinase

Lyn = Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog

Src = Rous sarcome

Yes = Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1

Yrk = Tyrosine phosphorylation regulated kinase

## **Definizione delle abbreviazioni**

APRIL = A Proliferation-Inducing Ligand)

ATM = Ataxia Teleangectasia Mutated

BAD = Bcl-2 Associated Death promoter

BAFF = B-cell Activating Factor

Bcl-2 = B cell lymphoma gene 2

BCR= Recettore a cellule B

Bid =BH3-interacting domain death agonist

BLNK = B-cell Linker

BMSC = Cellule stromali midollari

BSA = Albumina di siero bovino

Btk = Burton's Tyrosine chinasi

CARD11 = caspase recruitment domain 11

CDR = Regione complementare determinante

CD19 = Cluster of Differentiation 19

CD38 = Cluster of Differentiation 38

CD40L = Ligando di CD40

CHAPS =[ (3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CKIIa = Casein chinasi IIa

Csk = Src-chinasi C-terminale

C-terminale = Carbossi-terminale

CIP2A = Cancerous Inhibitor of PP2A

DAG = DiAcilGlicerolo

ECL = Enhanced ChemiLuminescence

EDTA = Acido etilen-diammino-tetracetico

EGTA = Acido etilen-glicol-bis2-aminoetiletere NNN'N'tetracetico

ERK = Extracellular signal Regulated Chinasi

Fab = Frammento legante l'antigene

FBS = Siero bovino fetale

Fc = Frammento cristallizzabile

F/H = Ficoll/Hypaque

Fc $\gamma$ Rs = recettori per la regione Fc delle immunoglobuline G (IgG)  
FITC= Fluoresceina isotiocianato  
F/H= Ficoll/Hypaque  
GA = geldanamicina  
GSK-3 $\beta$  = Glicogeno sintasi chinasi 3, isoforma  $\beta$   
HEAT = Huntington Elongation factor 3/pr65 A TOR  
HEPES = acido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic  
HLA-DR = Human Leukocyte Antigen D-Related  
HS1 = Hematopoietic cell-specific Lyn substrate-1  
Hsp90 = proteina da shock termico di 90kDa  
IEF= Isoelectric focusing  
Ig = Immunoglobulina  
IGVH = Regioni variabili delle catene pesanti delle immunoglobuline  
IL = interleuchina  
ITAM = Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
ITIM = Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif  
I1PP2A = inibitore 1 di PP2A  
I2PP2A = inibitore 2 di PP2A  
kDa = kiloDalton  
LLC-B = Leucemia Linfatica Cronica a cellule B  
LNs = linfonodi  
M-LLC = LLC mutato  
MAPK = Mitogen Activated Protein chinasi  
Nf-kB = Fattore nucleare-k B  
NK = Natural Killer  
NK-kB = Nucleor Factor-k B  
NLC = Cellule Nurse-like  
n-RTK = tirosin-chinasi non recettoriale  
N-terminale = Ammino-terminale  
PAGE = Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
PARP = Poli-ADP-Ribosio Polimerasi  
PBMC = cellule mononucleate da sangue periferico  
PBS = soluzione di fosfati tamponati

pI = punto isoelettrico  
 PI3K = fosfoinositide-3-chinasi  
 PKC = Protein chinasi-C  
 PLC  $\gamma$ 2 = Phospho Lypase C $\gamma$ 2  
 PMSF = fluoruro di fenilmetansulfonile  
 PP2 = 4-amino-5-(4chlorophenyl)7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4- d]pyrimidine  
 PP2A = proteina fosfatasi-2A  
 PTPs = protein tirosin-fosfatasi  
 RTK = tirosin-chinasi recettoriale  
 SET = Suvar3-9 Enancer of zeste, Trithorax  
 SDS = Sodio Dodecil Solfato  
 SDS/PAGE= SDS Elettroforesi Su Gel di Poliacrilamide  
 SHP-1/2 = Fosfatasi 1/2 contenente il dominio SH2  
 SH1/2/3 = dominio Src homology 1/2/3  
 sIgM = Immunoglobulina M di superficie  
 SK2 = sfingosina chinasi 2  
 SRBC = Globuli rossi di montone  
 SU6656 = 2-oxo-3-(4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-indol-2-ylmethylene)-2,3-dihydro-1*H*-indole-5-sulfonic acid dimethylamide  
 Syk = Spleen tyrosina chinasi  
 S1PR = Recettore della sfingosina 1 fosfato  
 TLRs = Recettori Toll-Like  
 TRIS = Tris-(idrossimetil)-aminometano  
 U/UM-LLC = LLC non mutato  
 Wb = Western blotting  
 ZAP-70 =  $\zeta$ -Associated Protein di 70 KDa  
 z-IETD-fmk = benzyloxycarbonyl-isoleucyl-glutamyl-[O-methyl]-threonyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethyl ketone  
 z-VAD-fmk = benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethyl ketone  
 [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP = ATP marcato con fosforo radioattivo in posizione  $\gamma$   
 2DE = Elettroforesi 2D



## RIASSUNTO

La leucemia linfatica cronica a cellule B (LLC-B) è la forma più comune di leucemia nell'adulto ed è caratterizzata dall'accumulo di piccoli linfociti B CD5+ nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici, dovuto sia a un aumento della proliferazione, che a un difetto dei meccanismi di morte cellulare programmata. Tra i fattori che contribuiscono alla sopravvivenza del linfocita neoplastico un ruolo fondamentale svolge l'attività anomala di diversi enzimi con attività fosfotransferasica che modulano le principali vie di segnalazione intracellulare, tra cui la lipide chinasi PI3K, la serina/treonina chinasi PKC, e le tirosin-chinasi Syk e Lyn. L'attività di ricerca svolta durante il mio dottorato si è concentrata sulla Src chinasi Lyn, la quale in questa patologia risulta sovra-espressa, iperattiva e delocalizzata nel citosol come componente di un complesso multiproteico aberrante. All'interno di questo complesso, Lyn è associata al chaperone molecolare Hsp90, il quale la preserva in conformazione attiva, così contribuendo all'elevata tirosin-fosforilazione basale tipica della LLC-B.

Lo scopo della mia indagine è stato identificare le molecole substrato dell'anomala attività di Lyn, potenzialmente coinvolte nei fenomeni di resistenza all'apoptosi dei cloni leucemici. Grazie all'applicazione di metodi biochimici e biomolecolari, nonché a un approccio bioinformatico, abbiamo identificato due substrati proteici di Lyn, la proteasi caspasi 8 e la proteina fosfatasi 2A (PP2A).

In primo luogo, abbiamo dimostrato che nelle cellule B di LLC, la procaspasi 8, zimogeno della caspasi 8, è fosforilata in Tyr380 ad opera di Lyn citosolico; tale fosforilazione comporta non solo l'inibizione dell'attività caspasiica ma anche il riarrangiamento strutturale della proteasi stessa, che nei cloni leucemici localizza nel citosol in forma dimerica. Tale inibizione viene rimossa usando sia inibitori di Lyn, come il dasatinib, sia inibitori di Hsp90, come geldanamicina, quest'ultimo provocando la rottura del complesso citosolico e quindi il calo dell'attività di Lyn e in ultima analisi attivando le vie apoptotiche estrinseca ed intrinseca.

In secondo luogo, abbiamo verificato che Lyn esercita un controllo negativo su uno dei fattori chiave della modulazione dei segnali che regolano la sopravvivenza cellulare, la serina/treonina fosfatasi PP2A. I nostri dati indicano

l'esistenza di un meccanismo d'inibizione dell'attività fosfatase di PP2A, che dipende sia dalla fosforilazione come tale in Tyr307 della subunità catalitica, ma anche dalla stabilizzazione dell'interazione della fosfatasi con il suo inibitore proteico cellulare SET, il quale è anch'esso sovra-espresso nelle cellule di LLC-B. La formazione di questo complesso stabile mantiene la fosfatasi in uno stato inattivo contribuendo quindi alla persistenza dei segnali di sopravvivenza mediati in particolar modo dalla serina/treonina chinasi Akt.

Inoltre, allo scopo di individuare nuove molecole in grado di riattivare PP2A e quindi utili a contrastare i segnali di sopravvivenza delle cellule leucemiche, abbiamo verificato l'utilità di un noto attivatore di PP2A, il fingolimod (FTY720), già impiegato nella sclerosi multipla e ultimamente rivelatosi efficace nel causare la morte cellulare in vari tipi di modelli di neoplasia. Il meccanismo di azione risiede nella capacità di rimuovere l'inibitore SET dalla subunità catalitica di PP2A. Questo composto, tuttavia, possedendo attività immunosoppressiva a causa dell'induzione della degradazione del recettore della sfingosina ma anche effetti collaterali a carico del sistema cardio-vascolare, può rivelarsi inadeguato nell'ottica di una più complessa strategia terapeutica in campo oncologico. Quindi sono stati sviluppati degli analoghi strutturali che non interferissero con il recettore della sfingosina ma destabilizzassero il complesso della PP2A fosforilata e SET. In questo modo è stato identificato un composto (MP07-66), con un'efficacia sovrapponibile al fingolimod sia nel disgregare il complesso che nell'inibire la protein chinasi Akt, fondamentale nel preservare i segnali di sopravvivenza. Inoltre tale composto era in grado di indurre apoptosi su cellule leucemiche, il quale effetto veniva incentivato dalla presenza di dasatinib con meccanismo sinergico, ulteriormente confermando il ruolo della fosforilazione nella stabilità del complesso PP2A/SET.

In conclusione, questo lavoro identifica PP2A e caspasi 8 quali substrati dell'attività citosolica aberrante di Lyn, confermando il ruolo chiave di questa chinasi nel supportare i molteplici segnali anti-apoptotici presenti nella LLC-B. I meccanismi molecolari di resistenza all'apoptosi qui identificati possono costituire dei potenziali bersagli per lo sviluppo di nuove terapie ad uso clinico.

## ABSTRACT

B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the commonest leukemia in the Western world and is characterized by the clonal expansion of small CD5+ B lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow and lymphoid organs, due to defective apoptosis. One of the crucial factors for the survival of B-CLL cells is the anomalous activity of a few enzymes such as the lipid kinase PI3K, the Ser/Thr kinase PKC and the tyrosine-kinases Syk and Lyn. My research focus was Src family kinase Lyn, which is overexpressed, constitutively active and delocalized in the cytosol within an aberrant multiprotein complex, in association with the molecular chaperone Hsp90, which in turn accounts for the high level of tyrosine-phosphorylation, ultimately contributing to the cancer phenotype of B-CLL cells.

The aim of my PhD work was to identify Lyn's cytosolic substrates potentially involved in the apoptosis resistance mechanisms observed in leukemia cells.

Using biochemical and biomolecular methods as well as a bioinformatics approach, two potential substrates of Lyn were identified, namely the cysteine protease caspase-8 and the protein phosphatase-2A (PP2A).

Firstly, we established that in B-CLL, the inactive zymogen of caspase-8, procaspase-8, is phosphorylated at Tyr380 by the cytosolic pool of Lyn, which brings about its inhibition and its structural rearrangements in a dimeric cytosolic form. The phosphorylation of Tyr380 of caspase-8 is abolished by the use of both the Lyn inhibitor dasatinib and the Hsp90 inhibitor geldanamycin, the latter of which also leads to the disassembly of the aberrant cytosolic complex and the drop in the Lyn's cytosolic activity, resulting in the caspase-dependent apoptosis.

Secondly, we verified that Lyn negatively affects the activity of one of the key factors in the modulation of cell survival signals, PP2A. Phosphorylation of the catalytic subunit of PP2A at Tyr307 causes inhibition of the phosphatase activity not only per se but also strengthening the interaction of PP2A with its cellular inhibitor SET, which is also overexpressed in B-CLL cells. As a result, PP2A is stably preserved in an inhibited form, which contributes to the persistence of prosurvival signals, in particular those mediated by the serine/threonine kinase

Akt. Moreover, to identify new compounds able to activate PP2A in order to contrast survival signals in B-CLL, we tested fingolimod (FTY720), which is already known as a PP2A activator, currently in use in the treatment of multiple sclerosis and recently emerging as a pro-apoptotic factor in different types of cancer cells. Notably, the mechanism of action consists in the ability of fingolimod to bind to SET and hence remove this cellular inhibitor of PP2A from its catalytic subunit. Since this drug is used as an immunosuppressive agent, by virtue of its provoking the degradation of the sphingosine-1-phosphate receptor, and shows cardiovascular side effects, it might prove unsuitable in a more complex therapeutic strategy. Therefore, fingolimod structural analogues which could not interfere with the sphingosine receptors, but could still destabilize the PP2A/SET complex were designed and synthesized. One of these compounds, MP07-66, showed an effectiveness similar to fingolimod, as to both the ability to disrupting the PP2A/SET complex and inhibit the protein kinase Akt, this latter being vital in preserving the survival signals. This compound also was able to induce apoptosis in leukemia cells, which effect was further enhanced by the combination with dasatinib by a synergistic mechanism, further confirming the role of phosphorylation in the stability of PP2A/SET.

In conclusion, this work identifies PP2A and Caspase 8 as substrates of the cytosolic aberrant activity of Lyn, confirming the key role of this tyrosine kinase in supporting multiple anti-apoptotic signals in the B-CLL. The molecular mechanisms of apoptosis resistance here identified may be potential targets in the development of new therapies for clinical use.

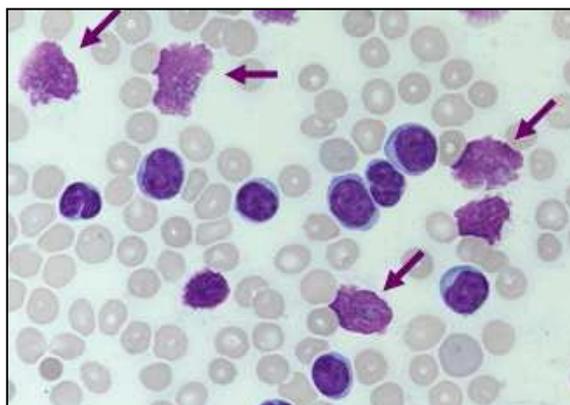
# INTRODUZIONE

## 1 - LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A CELLULE B

### 1.1 Eziologia, diagnosi e stadiazione

La leucemia linfatica cronica a cellule B (LLC-B) è un disordine linfoproliferativo cronico, di natura monoclonale, caratterizzato dall'accumulo di piccoli linfociti B nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici secondari (linfonodi e milza). Tale patologia rappresenta la forma di leucemia di più frequente osservazione nei Paesi occidentali, con un'incidenza annua di 5-15 casi ogni 100.000 abitanti; colpisce con maggiore frequenza il sesso maschile (rapporto maschi/femmine 1,5-2,0/1) e presenta un'età media d'insorgenza intorno ai 70 anni. L'eziologia della LLC-B non è nota; i principali fattori leucemogeni non sembrano associare allo sviluppo della malattia ma non può essere escluso un ruolo per le radiazioni ionizzanti [Linnet et al., 2007] o per l'impiego di pesticidi [Cocco et al., 2013].

Vi è evidenza di una predisposizione genetica. La LLC ha una bassa incidenza nelle popolazioni orientali rispetto agli occidentali e tale incidenza è mantenuta anche nei gruppi etnici che migrano in altri paesi [Yang et al., 2014]. Inoltre, la prevalenza di LLC è nettamente aumentata nell'ambito di alcune famiglie, nelle quali è stato osservato anche il "fenomeno dell'anticipazione" per cui, con l'avanzare delle generazioni, l'esordio della malattia tende a essere più precoce e il decorso clinico più severo [Awan et al., 2010]. La diagnosi di LLC-B avviene spesso in modo causale poiché i pazienti godono di pieno benessere fisico; essa si basa sulla presenza nel sangue periferico di un numero elevato di linfociti ( $>5 \times 10^9$ ) e sulla loro analisi immunofenotipica. Anche l'analisi morfologica dello striscio di sangue periferico offre utili informazioni diagnostiche: esso mostra piccoli linfociti a cromatina addensata e molti di essi tendono a rompersi allo striscio sul vetrino, originando le cosiddette "ombre di Gumprecht" (Figura 1).



**Figura 1.** Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da LLC-B. In viola i linfociti leucemici, le frecce indicano le ombre di Gumprecht che si originano dalla loro rottura.

Benché sia stata considerata a lungo una malattia indolente, le moderne conoscenze patogenetiche hanno consentito di riconoscere nella LLC una malattia dinamica [Chiorazzi et al., 2005], dal decorso clinico eterogeneo. Alcuni pazienti presentano un decorso clinico aggressivo con un rapido incremento delle cellule malate nel sangue tale da richiedere trattamenti terapeutici molto aggressivi: le ricadute sono comuni e i soggetti affetti incurabili. Altri pazienti rimangono asintomatici per anni e spesso non richiedono a lungo alcun trattamento [Hallek et al., 2008].

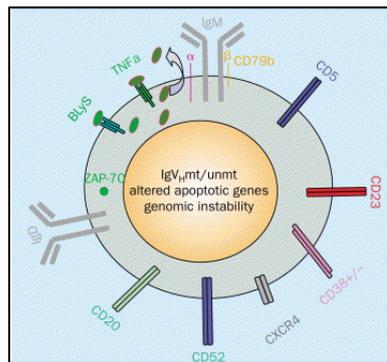
La classificazione dei pazienti affetti da LLC avviene sulla base dei dati ematologici e di alcuni parametri clinici, secondo i sistemi di stadiazione proposti da Rai e Binet riassunti in Tabella I.

<b>Gruppo di rischio</b>	<b>Stadiazione</b>	<b>Caratteristiche</b>
Basso	0 Rai A Binet	Solo linfocitosi >3 LN aree coinvolte, non citopenia
Intermedio	I Rai B Binet II Rai B Binet	+ Linfadenopatia ≥ 3 aree coinvolte, non citopenia + Organomegalia ≥ 3 LN aree coinvolte, non citopenia
Alto	III IV Rai C Binet	+ Anemia + trombocitopenia Anemia e/o trombocitopenia

**Tabella I.** Classificazione di Rai e Binet.

## 1.2 Marcatori molecolari della malattia

I linfociti B di LLC-B sono piccoli linfociti B “della memoria” caratterizzati da alcuni marcatori di superficie riconoscibili da specifici anticorpi monoclonali. Tali antigeni sono: CD19, CD21, CD5, CD23, CD25 ed HLA-DR. In particolare, le cellule di LLC-B esprimono un profilo immunofenotipico peculiare dei linfociti attivati che hanno incontrato l’antigene, e livelli ridotti in membrana di IgM, IgD e CD79 $\beta$  [Zhang e Kipps, 2014] (Figura 2).



**Figura 2. Fenotipo caratteristico di un linfocita B di LLC-B.**

L’eterogeneità riscontrata nel manifestarsi della patologia è associata allo stato di mutazione dei geni *IGVH* (Immunoglobulin Variable region Heavy-chain) e ai livelli di espressione di CD38<sup>+</sup> e ZAP70 (Zeta chain Associated Protein kinase 70) [Hamblin et al., 2007].

### **Stato mutazionale delle IgV<sub>H</sub>**

La trasduzione del segnale nel linfocita B è mediata dal BCR (B-cell Receptor) un’immunoglobulina presente sulla superficie cellulare. Ciascuna cellula B normale è caratterizzata da differenti BCR, i quali possono potenzialmente interagire con qualsiasi tipo di antigene. Nella porzione variabile del gene Ig, questa diversità è programmata dalla combinazione tra uno dei 51 segmenti del gene della Ig che codifica per la regione variabile (*V*), uno dei 27 segmenti del gene codificante la regione di diversità (*D*) e tra uno dei 6 codificanti la regione joining (*J*). La non precisa congiunzione tra *V* e *D* e tra *D* e *J* è seguita dalla delezione o dall’inserzione di nucleotidi, tanto che il segmento *D* potrebbe

comparire in tutte e tre le strutture finali. Le catene leggere delle Ig non sono molto diverse tra loro in quanto presentano solo i segmenti *V* e *J* [Hamblin, 2007]. Sulla base del grado di mutazione somatica dei geni delle regioni variabili delle catene pesanti delle immunoglobuline (IGVH), i pazienti LLC-B possono essere classificati in 2 sottogruppi, non mutati o U-LLC (*unmutated*) se mostrano oltre il 98% di omologia con la sequenza delle cellule germinali, oppure mutati M-LLC (*mutated*) se mostrano un grado di omologia inferiore al 98%. I pazienti che non presentano mutazione, U-LLC, mostrano un decorso della malattia sfavorevole, aggressivo e spesso una breve sopravvivenza, mentre i pazienti che mostrano mutazione, M-LLC, hanno un decorso lento e una aspettanza di vita molto maggiore [Hamblin et al., 1999].

Si pensa comunque che entrambe le tipologie M-LLC e U-LLC derivino da una singola linea cellulare, ciò conferma l'ipotesi per cui il comportamento differente tra le M-LLC e le U-LLC sia dovuto principalmente alla capacità che esse hanno di rispondere agli stimoli esterni, per esempio il grado di reattività del BCR. Infatti si pensa che le M-LLC proliferino più lentamente poiché il *signaling* del BCR è mediato da un ristretto numero di epitopi derivanti da antigeni esogeni che mostrano alta affinità per il recettore, e che proprio a causa della loro elevata affinità il loro legame causa l'anergia. Ciò spiegherebbe il decorso lento e stabile al quale vanno incontro i pazienti M-LLC. Al contrario, i pazienti U-LLC esprimono BCR polireattivi e non selettivi che legano molto più facilmente molecole presenti nel microambiente circostante e antigeni, per esempio vimentina, miosina, o fattori reumatoidi. La stimolazione del BCR avviene con maggiore facilità nei pazienti U-LLC, ciò si traduce in un decorso più aggressivo della malattia e correla con la maggiore espressione di ZAP70 [Burger e Chiorazzi, 2013].

Poiché l'analisi delle sequenze geniche per determinare lo stato di mutazione dei geni *IgVH* è laboriosa e non utilizzabile come metodo di routine nei laboratori di diagnostica, si utilizzano come marcatori alternativi CD38+ e ZAP-70 oppure alcuni marcatori sierici quali le chemochine CCL3 e CCL4.

## **ZAP70 e CD38**

ZAP70 è una tirosin-chinasi non recettoriale espressa normalmente dai linfociti T, dalle cellule NK, dalle cellule B attivate ma non da quelle quiescenti. Infatti, la maggior parte dei linfociti B non possiede questa molecola, ma invece presenta una tirosin-chinasi associata, Syk; si ritiene che la sua presenza nelle cellule B sia legata alla stimolazione antigenica.

Questa proteina è associata al recettore CD3 dei linfociti T, ed è coinvolta nella trasduzione del segnale a partire dal TCR (T-Cell Receptor) in seguito al legame dell'antigene; nelle cellule B ZAP70 sembra assumere una simile funzione nel trasdurre il segnale mediato dal BCR.

ZAP70 è uno dei marcatori molecolari più usati per distinguere lo stato mutato da quello non mutato, essendo appunto maggiormente espresso nelle U-LLC. Infatti, pazienti che mostrano un'espressione di ZAP70 in più del 20% delle cellule, hanno più probabilità di sviluppare il fenotipo UM-LLC e andare incontro ad un decorso aggressivo della malattia. Inoltre, la maggior espressione di ZAP70 nelle cellule U-LLC le rende maggiormente sensibili alle chemochine CCL19, CCL21 e CXCL12 (CXC-Ligando 12), stimoli che inducono un aumento della migrazione e proliferazione cellulare [Burger e Chiorazzi, 2013].

CD38 è una glicoproteina con attività ribosio adenosin-difosfato ciclastasi [Deaglio et al., 2006] che attraverso l'interazione con il suo ligando solubile CD31 promuove la proliferazione aumentando il segnale mediato dal BCR [Morabito et al., 2006]. Il CD38 è stato il primo marcatore dimostratosi strettamente correlato allo stato mutazionale dei geni *IGHV*, in seguito è stato provato che invece questi due parametri biologici sono fattori prognostici indipendenti [Hamblin et al., 2002]. Il CD38 rimane comunque un importante marcatore prognostico complementare, in genere correlato ad un decorso clinico più aggressivo, inoltre, studi recenti dimostrano che la sua attivazione regola i geni coinvolti nella proliferazione e motilità cellulare [Vaisitti et al., 2014].

In conclusione, l'alta espressione di ZAP70, CD38 e la mancanza di mutazione nei geni *IGHV* conferisce alle cellule un'elevata capacità di migrare nei tessuti in risposta alla stimolazione delle chemochine [Burger e Chiorazzi, 2013].

## **Chemochine della famiglia CC**

Le chemochine CCL3 e CCL4, chiamate anche proteine infiammatorie MIP1- $\alpha$  e MIP1- $\beta$ , sono chemochine della famiglia CC inducibili nelle cellule ematopoietiche in reazioni immunoattive (macrofagi, linfociti B e T e cellule dendritiche). CCL3 è un nuovo marcatore molecolare sicuro ed affidabile che può essere misurato con il saggio di immuno-assorbimento enzimatico ELISA. I livelli plasmatici di CCL3 sono indice di un decorso clinico aggressivo. Precedenti studi hanno dimostrato che in cellule di LLC-B in coltura *in vitro* con monociti NLC (*Nurse Like Cells*), l'aumentato livello del *signaling* del BCR induce una maggior sintesi e secrezione di CCL3 e CCL4, inoltre usando sia *in vivo* che *in vitro* inibitori del *signaling* del BCR, e si è osservato che i livelli di CCL3 e CCL4, sono sensibili all'inibizione del BCR. Rimane ancora da stabilire quale sia il contributo preciso di CCL3 nella patogenesi della malattia, ma si ritiene che la secrezione di questa chemochina serva ad attrarre cellule "accessorie" come linfociti T, NLC e cellule stromali nel microambiente, creando così un ambiente favorevole alla sopravvivenza dei cloni leucemici [Burger e Chiorazzi, 2013; de Weerd et al., 2013] .

### **1.3 Patogenesi della malattia**

#### **Origine e natura dei linfociti LLC-B**

Le cellule B patologiche che si accumulano progressivamente nel sangue periferico dei pazienti affetti da LLC-B derivano da aggregati proliferanti di prolinfociti e paraimmunoblasti, che costituiscono i cosiddetti pseudofollicoli o centri di proliferazione, presenti nei linfonodi, nella polpa bianca della milza e nel midollo osseo.

Evidenze sperimentali recenti hanno dimostrato che l'accumulo di cellule B anormali è dovuto ad uno squilibrio tra il processo di proliferazione e quello di morte cellulare ed è attribuibile non solo all'immortalità dei cloni ma anche ad un'attiva generazione di sub-cloni che in breve tempo sono in grado di modificare il rapporto tra proliferazione e morte. Non è del tutto chiaro se questi due processi

avvengano in tutti i cloni leucemici oppure solamente nei linfociti che presentano i marcatori di superficie specifici per l'interazione con i fattori di crescita e/o di morte cellulare [Chiorazzi et al., 2005].

Si ritiene che i cloni LLC derivino dalla trasformazione di un linfocita B CD5+ che mostra la capacità di produrre anticorpi, mediante una reazione T-indipendente ed è quindi riconducibile alla popolazione B-1 [Redaelli et al., 2004]. Poiché sia le cellule a configurazione mutata, M-LLC, sia quelle non mutate, UM-LLC, si trovano in uno stato attivato, è stata ipotizzata la loro derivazione dai linfociti B CD5+ residenti nella zona marginale. In alternativa, le cellule M-LLC potrebbero originare da linfociti B attivati per mezzo di una reazione T-indipendente che siano transitati nel centro germinativo, sede in cui avviene il processo di ipermutazione somatica del gene Ig. E' stata proposta inoltre, l'origine da cellule precursori (pre-B) e cellule B di transizione esprimenti autoantigeni, probabilmente caratterizzate da anomalie genetiche [Chiorazzi et al., 2005].

Le più recenti analisi di *sorting* cellulare, hanno verificato che le cellule M-LLC derivano da una cellula B della memoria CD5+CD27+, mentre i linfociti UM-LLC sono più simili a cellule CD5+CD27- che, in certi casi, vengono attivati in seguito alla stimolazione antigenica in maniera indipendente dai linfociti T [Zhang e Kipps, 2014]. I profili di espressione genica si sono rivelati pressoché simili nelle cellule M-LLC e nelle UM-LLC ma ben distinti da quelli delle cellule CD5+ normali, questa osservazione suggerisce che entrambi i sottogruppi UM-LLC e M-LLC probabilmente originano da cellule che hanno avuto esperienza dell'antigene. Ciò implica che i cloni LLC sono continuamente stimolati *in vivo*; non è stato invece ancora verificato se le cellule siano capaci di completare i processi di replicazione e divisione cellulare [Damle et al., 2002].

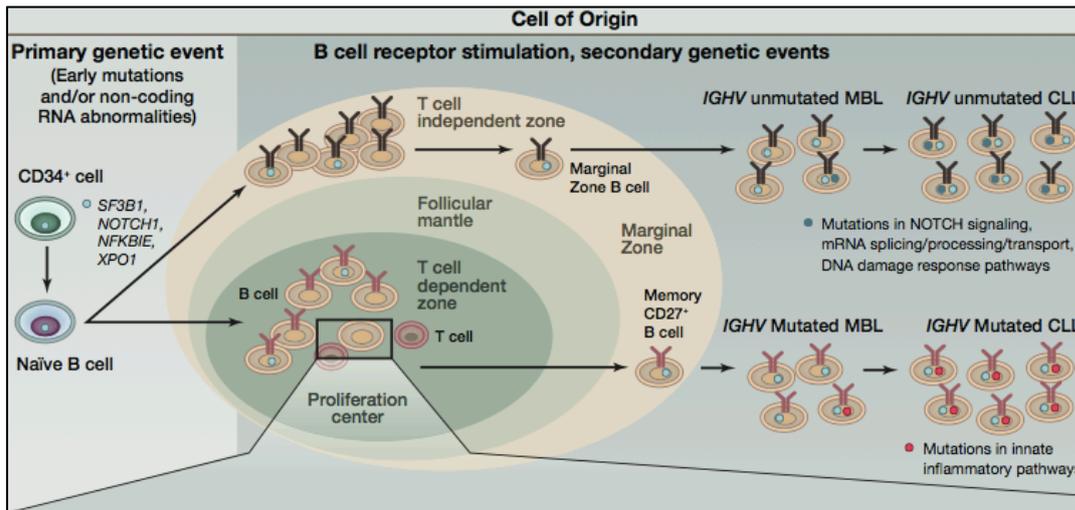


Figura 3. Origine e natura dei linfociti LLC-B. (Cancer Cell 26, Nov 10, 2014).

Per definire l'origine di questa malattia si è inoltre ipotizzato che nel processo di trasformazione maligna sia coinvolta una cellula staminale ematopoietica. Le analisi genetiche hanno rilevato la presenza di mutazioni acquisite a carico di oncogeni come SF3B1 e NOTCH1, sia nei progenitori mieloidi (CD34+) che nelle cellule LLC, ciò sta ad indicare che, le mutazioni scatenanti la patologia avvengono probabilmente nelle fasi precoci dell'evoluzione dei cloni. In accordo con tale ipotesi la cellula B "vergine" che ha acquisito mutazioni clonali casuali una volta nel linfonodo, acquisirebbe mutazioni secondarie in seguito all'attivazione del BCR, quest'ultime potrebbero favorire la sua definitiva trasformazione e quindi l'espansione clonale di una cellula B CD5+.

I geni mutati nelle cellule LLC-B sono diversamente rappresentati nelle cellule M-LLC e UM-LLC, e sono implicati in specifici processi cellulari, quali ad esempio, le via di segnalazione di Notch1, lo *splicing* dell'mRNA, la risposta al danno del DNA, e la risposta infiammatoria innata [Cicccone et al., 2014].

### Ruolo ricoperto dal microambiente

Le cellule B neoplastiche, se isolate dal sangue periferico o dai tessuti linfoidei di soggetti con LLC e poste *in vitro*, vanno rapidamente incontro ad apoptosi spontanea. *In vivo*, la loro sopravvivenza è invece sostenuta dal microambiente che li circonda e dalle cellule che lo compongono.

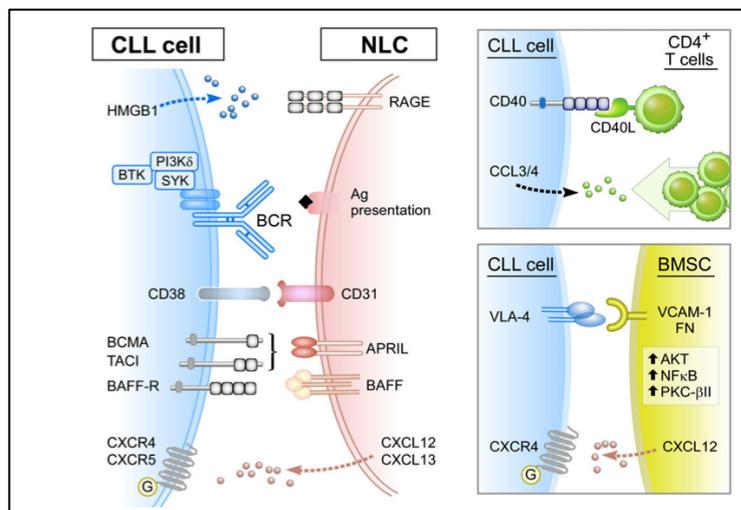
Le cellule LLC-B entrano in contatto con diverse cellule accessorie a livello del sangue periferico (cellule “nurse like”), dei linfonodi (linfociti T CD4+) e del midollo osseo (cellule stromali) (Figura 4). Gli studi condotti sulle interazioni esistenti tra le cellule LLC e le cellule stromali hanno permesso di comprendere i processi alla base dell'*homing*, della proliferazione e sopravvivenza delle cellule LLC, rivelandosi importanti per lo sviluppo di nuove terapie [Messmer et al., 2005].

Le cellule stromali tissutali, quali le cellule stromali midollari (BMSC), le cellule mesenchimali e le cellule “nurse-like” (NLC) sono componenti importanti del microambiente poiché forniscono segnali di sopravvivenza e migrazione ai cloni neoplastici. Tale interazione avviene nel midollo osseo e nei tessuti linfatici secondari, dove risiedono le cellule mesenchimali stromali. Le cellule stromali secernono chemochine che dirigono il ricircolo e l'*homing* ai tessuti delle cellule LLC [Burger et al., 2009] e forniscono ulteriori segnali che supportano la sopravvivenza e la crescita, proteggendo le cellule LLC dall'apoptosi spontanea oppure indotta da farmaci [Kurtova et al., 2009; Lagneaux et al., 1998].

Le NLC si sviluppano spontaneamente *in vitro* dai monociti presenti nelle colture di PBMC [Burger et al., 2009], e sostengono la vitalità delle cellule LLC, mediante l'attivazione di numerosi recettori di membrana e delle vie di segnale di sopravvivenza. Le cellule NLC attraggono e proteggono i linfociti LLC attraverso la secrezione di chemochine, quali CXCL12 (C-X-C motif ligand 12) e CXCL13 sostenendo la loro sopravvivenza attraverso i fattori BAFF (B-cell Activating Factor) e APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) [Nishio et al., 2005], e inoltre promuovono la progressione della malattia, come dimostrato di recente in alcuni modelli animali [Troeger et al., 2012]. La somiglianza tra i profili di espressione genica riscontrati nelle cellule LLC poste a contatto con le NLC [Burger et al., 2009] oppure isolate dai tessuti linfatici [Herishanu et al., 2011] identifica nelle NLCs, un valido modello per lo studio del microambiente della LLC.

Sia nel midollo osseo che nei linfonodi infiltrati dalle cellule di LLC-B è presente una popolazione di linfociti T CD4+ esprimenti CD40 ligando (L) (membro della superfamiglia del Tumor Necrosis Factor), normalmente espresso dai linfociti T attivati. Queste cellule tendono a concentrarsi in prossimità dei centri di

proliferazione, prendendo stretto contatto con i linfociti B patologici, i quali a loro volta esprimono costitutivamente il recettore CD40. La stimolazione via CD40/CD40L protegge le cellule neoplastiche dall'apoptosi e ne induce la proliferazione. Studi *in vitro* indicano inoltre che alcune citochine prodotte dai linfociti T (IL-4, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) inibiscono la risposta apoptotica delle cellule B neoplastiche, mediante up-regolazione di fattori anti-apoptotici. I linfociti B di LLC sono a loro volta in grado di plasmare il microambiente in cui si accumulano attraverso la secrezione di alcune chemochine, quali CCL17 e CCL22, creando un circuito autocrino in grado di sostenere il clone neoplastico [Ghia et al.; 2002].



**Figura 4.** Rappresentazione del microambiente presente nei linfonodi e dei fattori che sostengono la sopravvivenza delle cellule LLC-B. (*Pharmacol Ther.* 2014 Dec;144(3):338-348).

### Trasduzione del segnale mediata dal BCR

I segnali di proliferazione e morte cellulare vengono recepiti dalle cellule B mediante interazione con il BCR, struttura di membrana che propaga efficientemente gli stimoli al nucleo del linfocita B.

Il BCR è un complesso multimerico di membrana, composto di un'immunoglobulina di superficie legata alla membrana plasmatica per mezzo della sua regione costante (Frammento cristallizzabile, Fc) e che rivolge all'esterno la porzione legante l'antigene (Fab), ad essa associa l'eterodimero I $\alpha$ /I $\beta$  (CD79a/CD79b), deputato alla trasduzione intracellulare del segnale.

Il legame iniziale dell'antigene porta alla formazione del "signalosoma", un complesso di chinasi e proteine accessorie reclutate alla membrana plasmatica. L'evento chiave per la formazione del signalosoma è la fosforilazione dei motivi ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) sul lato C-terminale delle catene Iga e Igb ad opera della Src-chinasi Lyn. In seguito a fosforilazione, i motivi ITAM fungono da siti di ancoraggio per la tirosin-chinasi Syk mediante il suo dominio SH2, portando all'attivazione di Syk mediante e la fosforilazione da parte delle chinasi della famiglia Src (SFK) e la conseguente autofosforilazione. Il segnale è ulteriormente propagato da Syk mediante l'associazione con la proteina adattatrice BLNK (B-cell linker) e altre molecole a valle quali Btk (Bruton tyrosine kinase) e PLC- $\gamma$ 2 (Phospholipase C- $\gamma$ 2). L'attivazione di PLC- $\gamma$ 2 porta alla generazione di secondi messaggeri posti a valle come l'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG), i quali mediano rispettivamente il rilascio di calcio intracellulare e l'attivazione della protein chinasi-C (PKC). In seguito PKC induce l'attivazione di fattori di trascrizione, tra i quali NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) e NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Il reclutamento di PI-3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) sulla membrana plasmatica porta alla produzione di fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato (PIP3), che è richiesto per l'attivazione ottimale di Btk, e anche per il reclutamento di PDK e la conseguente attivazione di Akt. PLC- $\gamma$ 2 è inoltre coinvolta nell'attivazione delle vie MAPK, quindi delle chinasi ERK1/2, JNK e p38. La via ERK/MAPK può inoltre essere regolata dalla via di segnalazione mediata da RAS/RAF1.

L'ultima fase di eventi coinvolge la modulazione di numerosi regolatori a valle, i quali alla fine mediano i cambiamenti nella proliferazione cellulare, nella sopravvivenza e migrazione, sia attraverso la modulazione trascrizionale, sia mediante la fosforilazione. Per esempio, il *signaling* del BCR porta alla modulazione di regolatori chiave per la sopravvivenza (MCL-1, BIM) e per il ciclo cellulare (ciclina D2, MYC) [Stevenson et al., 2011].

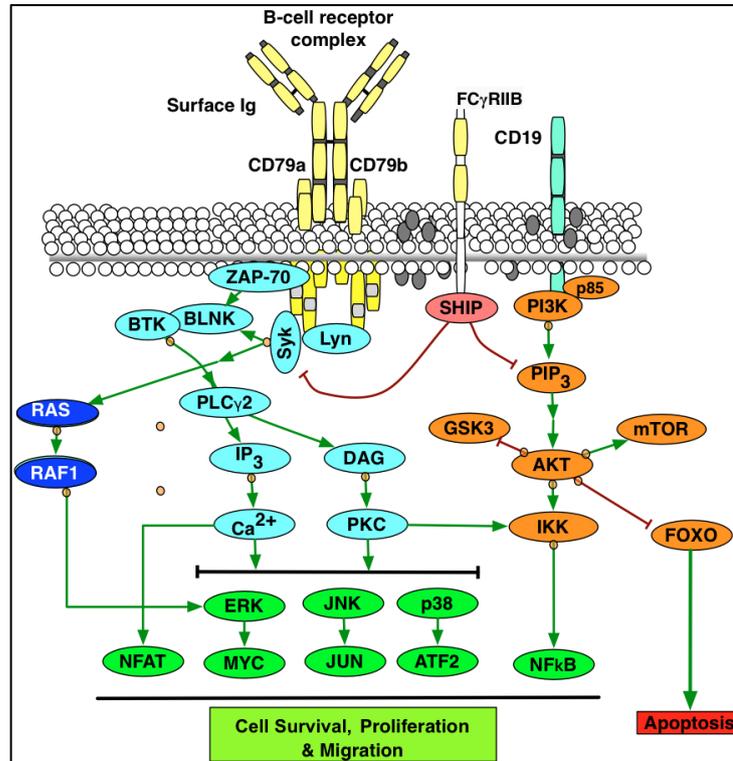
L'attivazione del BCR nelle LLC-B può essere dovuta al legame del recettore con l'antigene oppure può avvenire mediante un meccanismo ligando-indipendente (*signaling* tonico del BCR). E' stato dimostrato che la "sensibilità" del BCR ai fattori microambientali o agli antigeni che vi si legano, e quindi il grado di

attivazione delle vie di segnale dipende dallo stato mutazionale dei geni IgV<sub>H</sub>. Le U-LLC mostrano un'elevata attività del BCR grazie ad una bassa selettività del recettore per i ligandi, mentre le M-LLC invece mostrano un'attività minore poichè l'affinità del recettore si restringe ad un *pool* di epitopi che presentano grande affinità e che spesso portano allo stato di anergia. Si pensa invece, che alla base dell'attivazione ligando-indipendente, ci sia un meccanismo innescato dal legame tra la regione complementare 3 della catena pesante (HCDR3) e una regione denominata *framework region 2* (FR2) sulla regione variabile della catena pesante [de Weerd et al., 2011].

Sulla superficie cellulare della LLC-B esistono anche dei corecettori inibitori, come CD72, CD22, CD5, e FcγRIIb, e sono indispensabili per la modulazione del segnale trasdotto dal BCR. Questi recettori possiedono dei motivi ITIM, che vengono fosforilati da Lyn in seguito alla stimolazione del BCR. Questo comporta il reclutamento di fosfatasi inibitorie, come SHP-1, SHIP-1 e SHIP-2 e PTPN22, le quali attenuano il segnale trasdotto dal BCR defosforilando altre molecole a valle. In particolare, il recettore CD5, comunemente associato alle cellule di LLC-B, risulta attivato da Lyn nella malattia. La sua fosforilazione comporta il reclutamento in membrana della tirosin-fosfatasi SHP-1 la quale si ancora al recettore fosforilato tramite l'interazione con il suo dominio SH2, qui SHP-1 viene fosforilata da Lyn in Tyr536 e Tyr564; ciò comporta l'attivazione della fosfatasi stessa che va a contrastare il *signaling* del BCR. Il *pool* citoplasmatico di SHP-1 invece, viene inattivato dalla fosforilazione di Ser591, operata dalla PKC, una chinasi Ser/Thr attivata anch'essa da Lyn attraverso l'asse Lyn-Syk-PKC. Il risultato finale dell'attività di Lyn è dunque frutto di un preciso bilancio tra segnali di natura attivatoria e altri di natura inibitoria [Tibaldi et al., 2011].

Entrambe le risposte, quella positiva e quella negativa, sono modulate in modo stringente; e anche nelle cellule B normali, l'entità dell'attivazione delle diverse vie di segnale e i conseguenti effetti cellulari (proliferazione, sopravvivenza, apoptosi, anergia) sono influenzati da un ampio numero di fattori. Le vie di segnale trasdotte dal BCR non portano quindi ad una risposta univoca ma inducono una molteplicità di effetti che sono influenzati dallo stadio di sviluppo

della cellula B, dalla natura dell'antigene, dai livelli di espressione del BCR e dalla presenza di vie di segnale concomitanti [Stevenson et al., 2011].



**Figura 5. Vie di trasduzione del segnale a partire dal BCR.** Illustrazione delle vie di segnale mediate dal BCR e dai co-recettori inibitori. In seguito al legame della sIg con un antigene la tirosin-chinasi Lyn fosforila i domini ITAM delle catene Iga e Igβ, creando un sito di legame per proteine che possiedono un dominio SH2 come per esempio, la chinasi Syk; seguono poi altre reazioni a catena che culminano con l'immortalizzazione e la proliferazione incontrollata del linfocita B.

### Lesioni genetiche e citogenetiche

I marcatori prognostici della malattia possono essere ricercati anche in alcune lesioni genetiche comuni nella LLC-B, che interessano i geni NOTCH1, MYD88, TP53, BIRC3, ATM, SF3B1 [Rossi et al., 2013; Hallek, 2013].

Si tratta di mutazioni puntiformi come delezioni, sostituzioni, inserzioni, mutazioni *missense*, *nonsense* o combinazioni di mutazioni che causano disgregazione del gene. Tra le alterazioni genetiche si riscontrano:

- La delezione *13q14*, presente in più del 50% dei pazienti, predispone i cloni di cellule B leucemiche a mutazioni aggiuntive.

- Mutazioni nel gene NOTCH1 che codifica per una proteina transmembrana che agisce come fattore di trascrizione ligando-dipendente ed è coinvolta nei processi di differenziazione, proliferazione ed apoptosi cellulare tramite attivazione trascrizionale di altri geni come MYC, TP53 e molecole della via di NF-kB. Le mutazioni a carico di questo gene sono di tipo *frame-shift* o *non sense* raggruppate nell'esone 34, ed includono la ricorrente delezione c.7544-7545delCT.
- Mutazioni di tipo missenso nel gene SF3B1, che è un componente basilare nel processo di *splicing*. Le mutazioni a carico di questo gene sono di solito sostituzioni *missense* a livello di 5 *hotspots*, localizzate nelle regioni che codificano per le HEAT *repeats*. Le mutazioni a carico di questo gene sono presenti soprattutto nei casi di LLC che mostrano refrattarietà alla terapia (~15-20% dei casi).
- Mutazioni e delezioni che causano la degradazione di BIRC3, gene implicato nella regolazione negativa della MAP3K14 Ser/Thr chinasi, che è la principale attivatrice della via di *signaling* non canonica di NF-kB. A livello biochimico questi difetti genetici causano il taglio del dominio C-terminale RING, la cui attività E3 ubiquitin-ligasi è essenziale per la regolazione negativa di MAP3K14. Le lesioni a questo gene sono rare negli stadi iniziali della malattia, tendono invece ad accumularsi con la progressione della stessa e con il manifestarsi della refrattarietà.
- delezione 11q22-q23 del gene ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*), che codifica per una protein-chinasi che fosforila ed attiva p53, in risposta a danni alla doppia elica di DNA. Questa lesione causa l'inattivazione di ATM solo nel 30% dei casi in cui è presente, si ipotizza che un altro oncosoppressore possa essere codificato in questa regione, infatti BIRC3 potrebbe rappresentare un buon candidato, mappando nella regione 11q22.2.
- Nelle cellule B i *Toll-like receptors* (TLRs) hanno un ruolo centrale nella risposta antigene-indipendente del BCR, sensibilizzando vari modelli molecolari patogeni. A legame avvenuto i TLRs aggregano e danno inizio ad una cascata di segnali, reclutando varie molecole, tra cui MYD88, responsabile dell'attivazione di NF-kB. Esistono vari tipi di mutazione a

carico di MYD88, nelle LLC-B, ma la prevalente riguarda una sostituzione *missense* al L265P che va a colpire il B-B *loop* del dominio TIR, in ultima istanza ciò si traduce in un' aumentata sopravvivenza della cellula dovuta ad un'attivazione costitutiva della via di segnale mediata da NF- $\kappa$ B. Questa mutazione si trova maggiormente nei casi di M-LLC e in presenza della delezione del gene 13q14.

- delezioni 17p13 o mutazioni somatiche come mutazioni *missense* negli esoni 5-8 del gene TP53 ne causano l'inattivazione. Questo gene codifica per una fosfo-proteina nucleare tetramericata coinvolta nella regolazione della risposta apoptotica in seguito a danni subiti dal DNA [Rossi et al., 2013].

Le mutazioni cromosomiche a carico dei geni ATM e TP53 conferiscono resistenza ai trattamenti chemioterapici, poiché entrambi i geni sono coinvolti nel processo di apoptosi. Inoltre queste delezioni sono associate a pazienti con geni IgV<sub>H</sub> non mutati, che presentano quindi una prognosi infausta.

- La trisomia del cromosoma 12 è stata dimostrata nel 25% dei pazienti U-LLC. In questo cromosoma è presente il gene MDM-2 (*double minute murino 2*), il cui prodotto è un importante regolatore del gene oncosoppressore TP53 e la sua sovraespressione comporta un'inattivazione funzionale della proteina oncosoppressore p53. Nonostante ci siano evidenze a sostegno dell'iperespressione dell'mRNA di MDM-2, non è stata ancora rivelata la presenza di mutazioni in questo gene.
- Le delezioni del cromosoma 6, presenti in circa il 6% dei casi, causano eventi secondari riconducibili a prognosi intermedie.
- La proteina Bcl-2 è sovra-espressa nell'85% dei pazienti, anche se l'effettiva presenza di riarrangiamenti del gene bcl-2 localizzato in *18q21* è rara.

[Caligaris-Cappio e Ghia, 2008; Chiorazzi et al., 2005; Austen et al., 2005; Lin et al., 2008].

#### **1.4 Recenti approcci terapeutici: gli inibitori chinasi**

Gli inibitori selettivi delle chinasi sono entrati solo di recente nella terapia per la cura della LLC-B, nonostante la conoscenza delle vie di segnale e il ruolo preciso

che le chinasi ricoprono nelle LLC-B non sia del tutto chiaro, questi inibitori hanno mostrato risultati incoraggianti.

Un'importante azione svolta da queste molecole è l'inibizione delle interazioni delle LLC-B con il microambiente. Infatti, si pensa che gli inibitori chinasi modifichino le capacità di adesione e di migrazione delle LLC-B ai linfonodi e al midollo, portando ad un loro accumulo nel sangue periferico, dove sarebbero più inclini all'apoptosi spontanea o indotta da farmaci. Inoltre gli inibitori di chinasi dimostrano anche un effetto citotossico diretto ed una limitata tossicità [de Weert et al., 2013].

In passato, lo sviluppo di inibitori di chinasi si era focalizzato sui composti ATP-competitivi, che legavano cioè il sito dell'ATP della chinasi, ma due grossi problemi affliggevano questa categoria: il primo era la mancanza di specificità ed il secondo era la competizione con l'ATP che risultava sfavorevole dato le alte concentrazioni endogene di quest'ultimo. L'impiego di inibitori covalenti irreversibili rappresenta un'alternativa, poiché questi composti mostrano alta selettività farmacodinamica prolungata, ed un efficace superamento della competizione con l'ATP. Inoltre a conferire buona specificità a questi inibitori è d'aiuto il fatto che l'espressione di alcune chinasi è limitata quasi esclusivamente alle LLC-B, anche se effetti collaterali possono incorrere dato che BTK, PI3K $\delta$  e Syk sono espressi a bassi livelli anche da altre cellule ematopoietiche. La specificità di questi farmaci, infatti, non è da considerarsi assoluta e in questo complesso quadro è difficile comprendere con precisione il meccanismo d'azione e la risposta clinica evocata [Burger e Chiorazzi, 2013].

Di seguito sono elencati alcuni degli inibitori chinasi (Figura 6) che hanno destato maggior interesse in previsione di un futuro impiego in terapia per la cura della LLC-B:

*Dasatinib*. Il dasatinib è un inibitore chinasi di seconda generazione, reversibile e a largo spettro d'azione inizialmente progettato per il trattamento della leucemia mieloide cronica poiché inibitore di BCR-Abl chinasi, in seguito proposto come terapia nella LLC-B perché si scoprì inibire le chinasi SFK, quali ad esempio Lyn, e Btk. L'uso *in vitro* contrasta l'azione anti-apoptotica mediata dal CD40 e ripristina la sensibilità alla fludarabina, un agente citostatico analogo della purina,

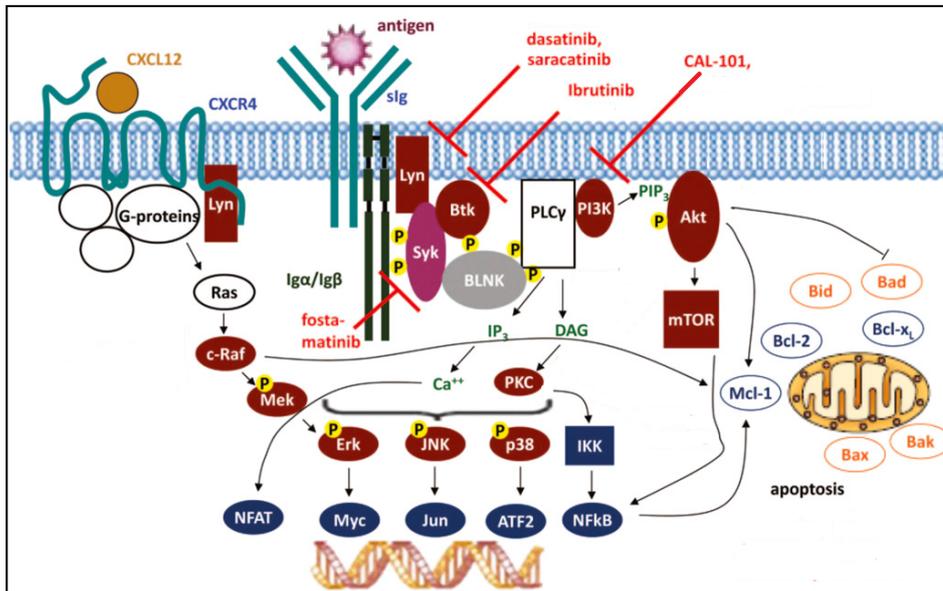
oltre a mostrare un effetto citotossico diretto. È stato testato sia in monoterapia che in combinazione [de Weert et al., 2013].

*Saracatinib*. Il Saracatinib è un altro inibitore delle chinasi della famiglia Src, è attualmente in fase clinica II. È stato testato su 23 linee cellulari di cancro colorettale e su pazienti con cancro al pancreas, che dimostravano un'attivazione costitutiva del signaling mediato dalle chinasi della famiglia Src dando risultati positivi e confermando che la sua attività pro-apoptotica è dovuta all'inibizione della cascata chinasica attivata dalle SFKs [Zhang e Yu, 2012].

*Ibrutinib*. Inibitore irreversibile di Btk, è stato sviluppato nel 2007, *in vitro* induce l'apoptosi di LLC-B solo in modesta misura. L'ibrutinib può contrastare l'effetto protettivo di CD40L, BAFF, TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-4, inoltre previene l'adesione indotta da anti-IgM, impedisce l'adesione e la migrazione delle cellule in risposta alle chemochine, infatti si pensa che riesca ad indurre l'uscita delle cellule LLC-B dai linfonodi e dal midollo, come suggerisce il breve innalzamento della conta linfocitaria nel sangue periferico che si riscontra in seguito alla terapia. Qui le LLC-B non sono più protette dal microambiente a loro favorevole e diventano inclini all'apoptosi spontanea o indotta. Questo meccanismo d'azione è attribuibile anche agli inibitori di Syk e di PI3K $\delta$ . Anche l'ibrutinib è stato testato in monoterapia e in terapia combinata [Byrd et al., 2014].

*Fostamatinib*. Il fostamatinib disodio (R788) è un profarmaco, il suo metabolita attivo si chiama R406 ed è l'unico farmaco della sua famiglia studiato per la terapia nelle LLC-B, infatti gli inibitori di Syk sono studiati per la cura di malattie autoimmuni come ad esempio l'artrite reumatoide. *In vitro* il fostamatinib, inibendo Syk, agisce sulla vitalità delle LLC-B che non viene ripristinata nemmeno se stimolate con anti-IgM o messe in cocultura con le NLC. Mostra sinergia con la fludarabina.

*Idelalisib*. L'idelalisib (GS-1101, CAL-101) è un inibitore specifico dell'isoforma p110 $\delta$  di PI3K $\delta$ , *in vitro* ha dimostrato indurre apoptosi nelle LLC-B, e di ridurre la migrazione attraverso l'inibizione dell'effetto prodotto dalle chemochine CXCL12 e CXCL13. Inoltre mostra minor effetti citotossici sulle cellule NK se confrontato con gli inibitori non selettivi delle PI3K ( $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ ) [de Weert et al., 2013].



*Figura 6 . Sito d'azione degli inibitori Dasatinib, Fostamatinib, Idealisib (CAL-101), Saracatinib e Ibrutinib.*

## 2 - TIROSIN-CHINASI LYN

### 2.1 Tirocin-chinasi della famiglia Src (SFK)

Le protein tirosin-chinasi comprendono un numero molto vasto di proteine ad attività enzimatica, di tipo recettoriale (RTK) e non recettoriale (n-RTK). Esse catalizzano la fosforilazione di varie molecole substrato, svolgendo un ruolo fondamentale nella trasmissione del segnale e nell'induzione della risposta cellulare. Un'aumentata attività delle tirosin-chinasi può portare alla persistente stimolazione delle vie di trasduzione del segnale con importanti conseguenze in diversi processi biologici, in particolare nella crescita e nel differenziamento cellulare, nell'apoptosi e nella cancerogenesi.

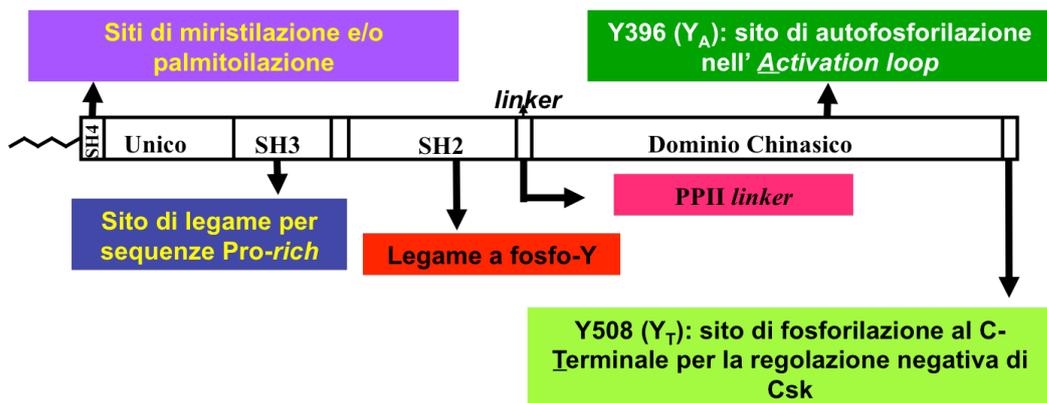
Le tirosin-chinasi della famiglia Src (SFK) sono tirosin-chinasi non recettoriali (nRTK), prive della porzione extracellulare e trans-membrana che è invece presente nella struttura delle tirosin-chinasi recettoriali (RTK). Esse catalizzano il trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP a residui tirosinici presenti in substrati specifici [Tatosyan e Mizenina, 2000].

Le SFK possono essere legate direttamente o indirettamente ai recettori di membrana (recettori dei fattori di crescita, degli ormoni e delle citochine) e mediano la risposta agli stimoli esterni, regolando diversi processi cellulari fondamentali quali la crescita cellulare, il differenziamento, la migrazione e la sopravvivenza [Roskoski, 2005].

La famiglia delle tirosin-chinasi Src comprende nove membri strutturalmente correlati tra loro: Src, Lck, Fyn, espresse in modo ubiquitario; Hck, Blk, Lyn, Fgr, Yes e Yrk, espresse quasi esclusivamente nelle cellule di origine ematopoietica. Le SFK sono enzimi multimodulari con un'organizzazione comune: tutte contengono domini SH2 e SH3 e sono poste sul lato citoplasmatico della membrana plasmatica, trattenute in parte mediante interazioni con proteine recettoriali transmembrana e in parte da catene lipidiche attaccate covalentemente. Membri diversi della famiglia SFK sono associati con recettori diversi e fosforilano serie sovrapposte ma distinte di proteine bersaglio. Ad esempio, nei linfociti, Lyn, Fyn e Lck associano ognuna a diversi tipi di recettori di membrana.

## **2.2 Struttura e regolazione della SFK Lyn**

Ogni membro SFK possiede un dominio unico all'N-terminale (SH4) che codifica per un sito di miristoilazione, e può contenere uno o due siti di palmitoilazione [Resh, 1999], seguiti da due domini omologhi deputati all'interazione proteica (SH3 e SH2) e da un dominio chinasi (SH1) (Figura 1) [Boggon e Eck, 2004]. Lyn è un membro della famiglia, espresso principalmente nelle cellule ematopoietiche, in particolare rappresenta la SFK più espressa nei linfociti B.



**Figura 7. Struttura a domini di Lyn.** Schema dei domini proteici di Lyn: Src Homology 4 (SH4), unico, Src Homology 3 (SH3), Src Homology 2 (SH2), e dominio chinasico, motivo prolinico nella regione cerniera (PPII linker). Sono indicate le tirosine fosforilate nella conformazione inattiva (pY508) e attiva (pY396).

Lyn può essere presente in due forme di *splicing* alternativo che generano due isoforme proteiche p53 e p56, denominate LynA (p56) e LynB (p53), che differiscono l'una dall'altra per la presenza di una regione di 20 aminoacidi nel dominio SH4 in cui è presente il residuo fosforilabile Tyr31.

Come per le altre chinasi SFK, la regolazione di Lyn avviene per opera di interazioni proteiche mediate dai domini SH2/SH3 e mediante la fosforilazione di residui tirosinici critici [Ingleby, 2012]. Nel suo stato inattivo, Lyn è fosforilata al C-terminale (Y508) dalla chinasi Csk che crea un sito di legame per il suo dominio SH2. Il dominio SH3 può legarsi a un motivo prolinico situato tra i domini SH2 e il dominio chinasico SH1 (regione cerniera), generando in questo modo una conformazione inattiva e stabile. L'attivazione di Lyn può avvenire mediante la defosforilazione della tirosina posta al C-terminale (Y508) a carico di fosfatasi come CD45 [Wang et al., 2002] e SHP-2 [Futami et al., 2011], oppure attraverso l'interazione di motivi di legame ai domini SH2 e/o SH3, i quali competono con i siti d'interazione per SH2/SH3 della chinasi stessa. Infine, la conformazione del tutto attiva è dovuta a un processo di autofosforilazione del *loop* di attivazione a carico della tirosina 396 (Y396). La fosforilazione di questo *loop* altera la sua struttura in modo che la tasca per il Mg-ATP diventa più accessibile, aumentando in questo modo, la potenziale attività chinasica [Xu et al., 1999]. La struttura del dominio chinasico di Lyn è stata determinata sia in conformazione attiva, non fosforilata, sia complessata ad alcuni inibitori; ciò ha

permesso di capire le basi molecolari dell'inibizione di Lyn a carico di questi composti [Williams et al, 2009].

Le analisi condotte *in vitro* rivelano che lo stato di fosforilazione di Tyr396 è critico per la regolazione dell'attività enzimatica [Sun et al., 2002]; *in vivo*, questo effetto regolatorio è modulato principalmente dal dominio C-terminale e/o dalle interazioni SH2/SH3. Infatti, i processi di attivazione e inattivazione di Lyn sono ulteriormente controllati mediante la sua associazione con interattori e adattatori proteici localizzati nei diversi compartimenti cellulari, come ad esempio Cpb/PAG1, presente principalmente nei *lipid rafts* [Kawabuchi et al., 2000; Brdicka et al., 2000]. Nel processo d'inattivazione di Lyn, sono note le fosfatasi SHP-1 e SHP-2, le quali interagiscono a loro volta con molecole fosforilate da Lyn, e defosforilano il sito attivatorio pTyr396, e quindi si rivelano cruciali per la modulazione negativa di questo enzima [Somani et al., 2000].

Studi recenti hanno dimostrato il ruolo importante della tirosin-chinasi Lyn, SFK prevalentemente espressa nelle cellule ematopoietiche dove controlla molti processi cellulari. Anomalie nell'espressione proteica, nell'attività e nella localizzazione sub-cellulare di questa chinasi sono state correlate all'insorgenza di malattie autoimmuni, leucemie e linfomi, tumori solidi e infine allo sviluppo dei fenomeni di resistenza alla chemioterapia. Analisi proteomiche condotte su 130 linee tumorali hanno verificato che Lyn si riscontra frequentemente in forma attiva. In particolare, è stata rivelata l'utilità terapeutica degli inibitori di Lyn per il trattamento di numerose neoplasie [Whiting et al., 2012], tra queste la leucemia mieloide cronica, la leucemia mieloide acuta [Ikeda et al., 2009] e la leucemia linfatica cronica (LLC-B) [Contri et al., 2005].

Studi condotti nel laboratorio in cui ho svolto il dottorato, hanno in precedenza identificato Lyn quale potenziale bersaglio molecolare per la terapia contro la LLC-B e definito il contributo fondamentale di questa tirosin-chinasi nel sostenere la sopravvivenza delle cellule neoplastiche.

### **2.3 Ruolo di Lyn nella patogenesi della LLC-B**

## **Modulazione delle vie di segnale**

Lyn è la tirosin-chinasi SFK predominante nei linfociti B, dove svolge un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale mediato dal BCR. La chinasi si pone così come regolatore essenziale di molti eventi di segnalazione successivi, quali la maturazione, la proliferazione, l'apoptosi e la tolleranza delle cellule B. Lyn partecipa agli stadi iniziali della trasduzione del segnale e gioca un ruolo essenziale nel mediare gli eventi successivi al contatto del BCR con l'antigene.

Lyn è la prima SFK a trasdurre il segnale a partire dal BCR poiché fosforila i motivi ITAM posti sulle catene Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  del recettore stesso. Dopodichè vengono reclutate ed attivate altre chinasi e molecole adattatrici a valle, quali Syk, PLC $\gamma$ 2, PI3K, Btk, Vav e BLNK, che formano il "signalosoma" che trasduce il segnale dal BCR e attivano le vie di segnalazione poste a valle.

Studi su topi Lyn $^{-/-}$  hanno dimostrato che questa protein chinasi intracellulare partecipa oltre che positivamente, anche negativamente al segnale mediato dal BCR [Hibbs et al., 2002]. Infatti, Lyn regola in modo negativo l'attivazione del BCR, andando a fosforilare i motivi ITIM sui co-recettori negativi CD22, CD5, CD72 e FC $\gamma$ RIIB che a loro volta reclutano le fosfatasi PTEN, SHIP-1 e 2 e SHP-1 [Stevenson et al., 2011; Tibaldi et al., 2011].

Nei linfociti B di LLC è stata riscontrata una diretta correlazione tra l'aumento dell'attività basale della tirosin chinasi Lyn, dovuto ad una sua attivazione costitutiva non mediata dal BCR, ed il difettivo meccanismo apoptotico caratterizzante i cloni cellulari neoplastici [Contri et al., 2005].

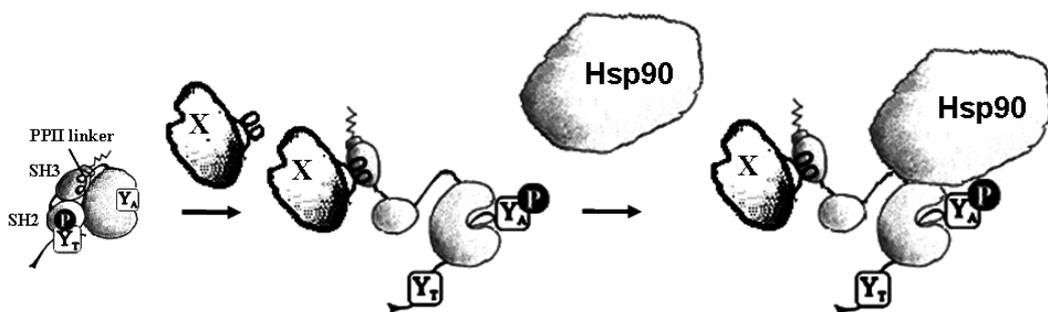
## **Disregolazione e delocalizzazione di Lyn**

Nel laboratorio dove ho svolto il dottorato di ricerca, è stato dimostrato che Lyn in LLC-B possiede caratteristiche anomale [Contri et al., 2005]. In particolare, il livello proteico di Lyn in cellule isolate da pazienti affetti da LLC risulta dalle 2,5 alle 5 volte superiore rispetto ai normali linfociti B. Questa sovra-espressione sembra non essere dovuta ad un aumento od ad una differente stabilità del mRNA, ma ad un differente *turnover* proteico, correlato ad una variazione nella regolazione del sistema di degradazione. Inoltre è stata determinata una diversa

distribuzione sub-cellulare della chinasi: mentre nei linfociti B normali Lyn è localizzata solo ed esclusivamente nei microdomini di membrana *lipid rafts*, nelle cellule di pazienti affetti da LLC la chinasi è delocalizzata in tutta la superficie della membrana plasmatica, ma cosa ancora più sorprendente, è presente per 1/3 del totale nel citosol.

Nelle cellule ematopoietiche, la presenza di Lyn nel citosol è una conseguenza del taglio da parte delle caspasi a livello dell'estremità N-terminale (regione con cui la chinasi interagisce con le membrane), ed è un meccanismo che si attiva in seguito all'apoptosi mediata dal BCR. Invece la localizzazione citosolica di Lyn in cellule B non stimolate è una proprietà unica dei linfociti di pazienti affetti da LLC. Probabilmente, tale delocalizzazione potrebbe essere dovuta a difetti nell'acilazione della chinasi [Contri et al., 2005]. Inoltre, in cellule LLC-B, la chinasi è costitutivamente attiva e questa peculiarità è dimostrata anche da un'elevata fosforilazione tirosinica basale e da una bassa risposta allo stimolo del BCR. Il trattamento dei linfociti leucemici con inibitori specifici per l'attività di Lyn, come PP2 e SU6656, ristabilisce l'evento apoptotico accompagnato da una diminuzione dell'attività chinasi Lyn-dipendente suggerendo una correlazione tra l'alta attività basale della chinasi e la mancata apoptosi delle cellule B leucemiche.

Nelle cellule LLC-B è stato inoltre dimostrato che Lyn è parte integrante di un complesso citosolico aberrante di circa 600 kDa [Trentin et al., 2008].



**Figura 8. Ipotetico modello sequenziale di assemblaggio del complesso citosolico di Lyn.**  
(*Blood*, 2008 vol. 112, num. 12, pag. 4665-4674)

In questo complesso, Lyn citosolico è presente in conformazione attiva ed è associato con HSP90 (attraverso il suo dominio catalitico), HS1 e SHP-1L

(mediante il dominio SH3). Queste proteine sono responsabili di alcune delle proprietà anomale di Lyn, come l'alterato *turnover*, l'atipica localizzazione nel citosol e l'attivazione costitutiva.

HS1 (Hematopoietic lineage cell specific protein 1) è una proteina con espressione limitata alle cellule di origine ematopoietica ed è localizzata prevalentemente nel citoplasma. La funzione di HS1 non è nota. E' probabile che sia coinvolta nella trasduzione del segnale proliferativo e apoptotico indotto dal BCR e dal TCR perchè è la prima proteina a fosforilarsi in tirosina in seguito a stimolazione di tali recettori antigenici. La fosforilazione avviene secondo un modello sequenziale: dapprima Syk fosforila i residui di Tyr378 e Tyr397 della proteina agendo come chinasi primaria e creando dei siti di legame ad alta affinità per il dominio SH2 di Lyn [Brunati et al., 2005]. A questo punto HS1 interagisce con i domini SH2 di Lyn che fosforila il residuo di Tyr222.

L'azione di queste chinasi su HS1 ha importanza nel determinare la sua localizzazione: la fosforilazione da parte di Syk determina il suo spostamento dal citosol nei subdomini *lipid rafts*. Una volta in membrana, HS1 viene fosforilata in Tyr-222 da parte di Lyn, con conseguente traslocazione al nucleo [Hao et al., 2004]. E' descritto che HS1 può interagire anche con il dominio SH3 delle SFK perché contiene diversi motivi strutturali inclusa una regione Pro-rich (324-393) ed un dominio SH3 a livello del C-terminale.

Nella LLC-B è stato dimostrato che lo stato di fosforilazione di tale proteina è associato alla prognosi dei pazienti [Scielzo et al., 2005] e che in un sottogruppo di pazienti, la fosforilazione di HS1 è diversamente regolata ad opera della chinasi Lyn [ten Hacken et al., 2013]. Inoltre è stato dimostrato che HS1 è sovraespressa nelle cellule B di LLC-B rispetto ai linfociti B normali e lo è maggiormente nei pazienti che presentano una prognosi più sfavorevole [Frezzato et al., 2012].

SHP-1 è una tirosin-fosfatasi coinvolta nella regolazione negativa del *signaling* delle cellule B. Infatti, dopo stimolo del BCR, questa viene reclutata in membrana dove esercita un'azione di defosforilazione tirosinica in grado di inibire il segnale trasdotto. SHP-1L è un'isoforma di SHP-1 ed è predominante nei tessuti ematopoietici. Questa isoforma è più lunga di SHP-1 poiché presenta 29 residui

aminoacidici in più al lato C-terminale. In questa regione, SHP-1L presenta una sequenza ricca in prolina PVPGPPVLSP, potenziale sito di legame del dominio SH3 di Lyn [Jin et al., 1999].

HSP90 (Heat shock protein 90) è un'abbondante "chaperone", espressa in modo ubiquitario che è necessaria per aiutare le proteine a ripiegarsi nel modo corretto, per la traslocazione delle proteine attraverso le membrane, per il controllo di qualità nel reticolo endoplasmatico e per il turnover proteico. Partecipa anche alla regolazione post-traduzionale delle molecole segnale, all'assemblaggio dei complessi di trascrizione e al processamento di peptidi immunogenici da parte del sistema immunitario. HSP90, inoltre, regola la stabilità, l'attività e la biogenesi delle proteine clienti: infatti la "chaperone" è essenziale per la maggior parte di queste proteine per la maturazione ad uno stato competente d'attivazione. Non modifica il substrato sul quale agisce ma ne altera la conformazione. HSP90 è richiesta per la biogenesi di molti polipeptidi, ma la maggior parte dei substrati sono molecole per la trasduzione del segnale che svolgono la loro funzione in processi di sviluppo, controllo della crescita e sopravvivenza [Citri et al., 2006].

Le chaperone non agiscono da sole, ma entrano a far parte di complessi multiproteici che contengono varie co-chaperones. HSP70, HSP90, HSP40, Cdc37 e HOP sono "co-chaperone" minime necessarie per aiutare una tirosin-chinasi a ripiegarsi *in vitro*. La proteina appena sintetizzata e non ripiegata si lega a HSP40 e HSP70. Il complesso ternario è stabilizzato da idrolisi dell'ATP da parte di HSP70 catalizzato da HSP40. A questo stadio si può legare debolmente Cdc37; questo complesso intermedio interagisce con HSP90 mediante Hsp organizing protein (HOP) [Caplan et al., 2007]. Quando l'ATP è legato e idrolizzato, il complesso entra nella forma matura in cui Cdc37, p23 e immunofiline prendono il posto delle "co-chaperone" e assistono la maturazione della proteina. Il reclutamento della chinasi da parte di HSP90 dipende da Cdc37, che contribuisce così all'attivazione della chinasi facendole interagire con il complesso di HSP90 [Pearl et al., 2008]. Il reclutamento della chinasi è mediato dal segmento N-terminale di Cdc37 che lega l'elica C e i foglietti  $\beta 4$  e  $\beta 5$  nelle chinasi non recettoriali, mentre il P-loop non sembra essere coinvolto. La regione centrale e il segmento C-terminale di Cdc37 mediano l'interazione con il

segmento N-terminale di HSP90, responsabile per il legame dell'ATP e dei suoi inibitori. Il legame di Cdc37 al segmento mobile del dominio N-terminale di HSP90 impedisce la chiusura del segmento stesso sul sito di legame dell'ATP e quindi non si può verificare il cambiamento conformazionale guidato dall'ATP [Pearl et al., 2008]. Il lobo maggiore della chinasi interagisce con il segmento centrale del monomero di HSP90, mentre il lobo minore prende contatto con il dominio N-terminale di HSP90 associato o con la parte N-terminale di Cdc37. Il lobo della chinasi deve essere intatto perché si verifichi il legame con HSP90 e con Cdc37, e per quest'ultima anche il loop ricco di glicina è importante. La regione C-terminale della chinasi, in particolar modo l'elica C e i segmenti linker tra i lobi, serve solo per il legame con HSP90 [Pearl et al., 2008]. Il sito di legame dell'ATP nel dominio N-terminale è anche il sito di prodotti naturali, strutturalmente non correlati, come la geldanamicina (GA). Questi composti legano il sito con maggiore affinità rispetto ai nucleotidi naturali, e impediscono alla "chaperone" di ciclare tra la conformazione che lega l'ATP e l'ADP. Il legame della geldanamicina altera le normali funzioni di HSP90, interferendo con il riconoscimento del substrato. Così le proteine legate al complesso nello stato intermedio, in seguito al reclutamento dell'enzima E3 ubiquitina ligasi, vengono degradate via proteosoma determinando una diminuzione dei livelli della proteina stessa. La degradazione mediante ubiquitina proteosoma è un meccanismo irreversibile per down-regolare le Src chinasi attivate dalla stimolazione del recettore. Il destino della chinasi dipende da due meccanismi differenti: targeting per la degradazione mediante ubiquitinazione e salvataggio dalla degradazione mediante azione di HSP90. Quindi gli inibitori farmacologici di HSP90 che competono per il sito di legame dell'ATP, impediscono l'attivazione della proteina cliente [Giannini e Bijlmakers, 2004].

## 3 - CASPASI 8

### 3.1 Processo apoptotico

La morte cellulare programmata (apoptosi) è una delle forme più comuni di morte cellulare negli organismi multicellulari e gioca un ruolo principale durante il normale sviluppo e nella regolazione di vari processi fisiologici. Un fine equilibrio tra la proliferazione e la morte cellulare programmata è cruciale nel mantenere l'omeostasi in molti tessuti [Evan e Vousden, 2001]. Ogni aumento o decremento nel tasso di apoptosi può perturbare questo equilibrio e può portare a difetti nello sviluppo oppure all'insorgenza di numerose patologie umane. Ad esempio, la mancata apoptosi promuove l'insorgenza e la progressione del cancro. Infatti, una delle caratteristiche salienti dei tumori umani è l'evasione dal processo apoptotico, cioè l'incapacità di andare incontro all'apoptosi in risposta ai segnali che normalmente riducono la crescita incontrollata [Fulda, 2009].

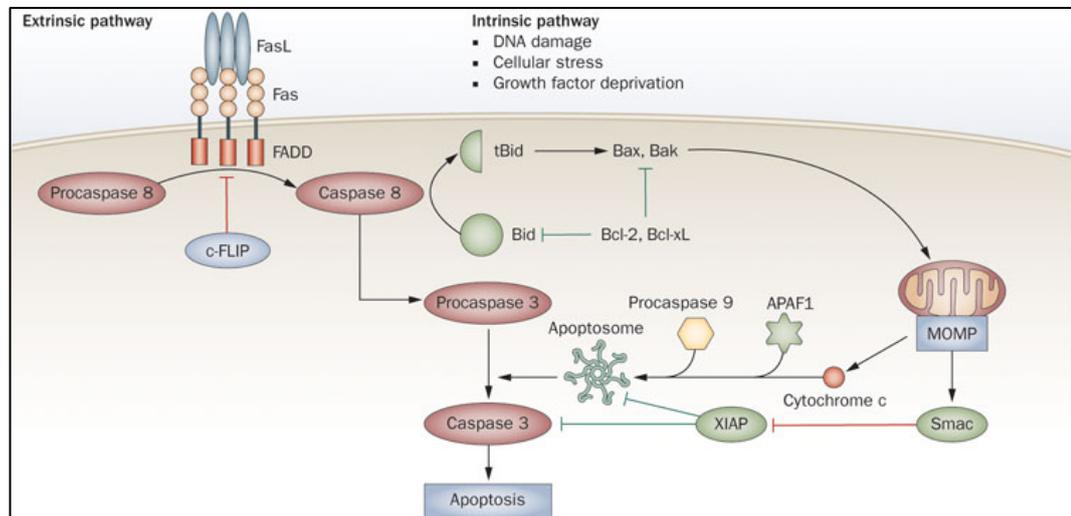
La scoperta del macchinario di morte cellulare negli ultimi due decenni ha portato all'identificazione di molecole chiave nelle vie di segnale che sono coinvolte nella regolazione dell'apoptosi. Il processo chiave dell'apoptosi è rappresentato dall'attivazione proteolitica delle caspasi, cistein-proteasi così denominate per la loro capacità di tagliare legami peptidici dopo residui di acido aspartico [Stupack, 2013]. Le caspasi sono normalmente presenti nella cellula in forma inattiva (zimogeno) e sono costituite da un pro-dominio, seguito da due subunità catalitiche attive che sono separate da un corto dominio *linker*. Durante l'attivazione, il pro-dominio è rimosso ed il dominio *linker* viene tagliato, generando così una caspasi attiva matura formata da due subunità grandi e due piccole [Sohn et al., 2005].

Le caspasi possono essere divise in due gruppi: caspasi iniziatrici ed effettrici. Le iniziatrici (-8, -9, -10), sono attivate mediante l'associazione con un complesso recettoriale detto "death receptor" o con un gruppo di proteine citoplasmatiche detto apoptosoma. Le caspasi effettrici (-3, -6, -7), invece, sono attivate dalle caspasi iniziatrici ed agiscono su diversi substrati cellulari [Sohn et al., 2005]. L'apoptosi può essere avviata mediante due *pathway* illustrati in Figura 9:

- Via estrinseca, si basa sulla stimolazione dei “death receptors” (Fas/CD95, TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2), un sottogruppo della famiglia di recettori TNF, che sono tutti caratterizzati dalla presenza di un dominio intracellulare, chiamato “dominio di morte” (DD). Ne è un esempio, il recettore Fas che, in seguito all’interazione con il suo ligando (FasL), interagisce con la proteina citoplasmatica FADD (Fas associated death domain protein). Il FADD, legato al recettore, è così in grado di reclutare la forma inattiva della caspasi-8 (procaspasi 8), determinando la formazione del complesso molecolare chiamato DISC (death inducing signalling complex) [Nuñez et al., 1998]. Nell’ambito del DISC vengono reclutate più molecole di procaspasi 8, consentendo la loro reciproca attivazione mediante dimerizzazione. Infatti, viene eliminato il pro-dominio (DEAa e DEAb, death effector domains) e la molecola rimanente viene tagliata in due subunità: p18 e p11, che formeranno il tetramero attivo. Dal DISC vengono quindi rilasciate in successione molecole di caspasi-8 attive, liberando siti disponibili per nuove molecole di procaspasi 8. La caspasi-8 attiva direttamente le caspasi effettrici (caspasi-3, -6 e -7), che a loro volta agiranno su substrati specifici; queste reazioni convergeranno nell’attivazione di endonucleasi che porteranno a termine il “suicidio” cellulare, mediante frammentazione del DNA [Yao et al., 2007].

- Via intrinseca, coinvolge i mitocondri, il reticolo endoplasmatico e la proteina pro-apoptotica BID (appartenente alla famiglia Bcl-2). Infatti, in seguito al clivaggio proteolitico attuato dalla caspasi-8, un frammento di BID trasloca nei mitocondri, inducendo la permeabilizzazione della membrana esterna. A questo fa seguito il rilascio di proteine pro-apoptotiche mitocondriali come citocromo c, Smac-Diablo e la proteasi Hlra2/Omi. In particolare il citocromo c attiva l’assemblaggio della caspasi-9 e dell’apoptosoma, che a sua volta attiva la caspasi-3. Inoltre la caspasi-3 è in grado di attivare autonomamente le caspasi-8 e -9, stabilendo un circuito di auto-amplificazione delle caspasi. Le altre proteine pro-apoptotiche mitocondriali sono invece in grado di rallentare o bloccare le funzioni di inibizione delle caspasi svolte da membri della famiglia di proteine inibitrici dell’apoptosi (IAP), facilitando ulteriormente l’attività delle caspasi [Nuñez et al., 1998]. Inoltre bisogna ricordare che la permeabilizzazione della

membrana mitocondriale esterna può essere indotta, oltre che dalla caspasi-8, anche da numerosi stimoli fisiologici o fisiopatologici (radiazioni UV, farmaci citotossici, radicali liberi, citochine e fattori di crescita).



**Figura 9. Via apoptotica estrinseca ed intrinseca.** Entrambe le vie, estrinseca (a sinistra) ed intrinseca (a destra), hanno in comune l'attivazione degli effettori centrali dell'apoptosi, un gruppo di proteasi chiamate caspasi, che dirigono la distruzione degli elementi strutturali (citoscheletro) e funzionali (organuli) della cellula (Nat Rev Rheumatol. 2011 Mar;7(3):152-60).

Recentemente è stato descritto un nuovo meccanismo di morte cellulare, definito caspasi-indipendente. Non solo le caspasi, ma anche le calpaine, le catepsine, endonucleasi e altre proteasi possono attuare una morte cellulare programmata. Questi fattori possono essere rilasciati e attivati da diversi organelli cellulari, inclusi i mitocondri, i lisosomi e il reticolo endoplasmatico, i quali possono agire indipendentemente o collaborare uno con l'altro [Bröker et al., 2005].

### 3.2 Molteplici ruoli di caspasi 8

Caspasi 8, un membro della famiglia delle caspasi, è una delle molecole cruciali per l'induzione della morte cellulare, specialmente mediante la via dei recettori di morte [Frish, 2008].

Caspasi-8 è una proteina di 55 kDa, composta da 480 aminoacidi che comprendono due domini effettori di morte (DED, death-effector-domains) che

localizzano al lato N-terminale e un dominio catalitico in C-terminale. I domini DED costituiscono delle vere e proprie piattaforme, dove avvengono interazioni proteiche.

Nella maggioranza delle cellule, caspasi 8 è una caspasi iniziatrice presente in forma di proenzima (zimogeno) in stato inattivo. In seguito all'attivazione proteolitica, la molecola attiva di caspasi 8 è composta di un eterotetramero che consiste di due subunità grandi e due subunità piccole. Questa cistein-proteasi mostra una certa specificità di substrato per le sequenze I/L/V/E X D.

Studi genomici hanno rivelato che il gene *CASP8* mappa nel cromosoma 2q33.1 e codifica per un mRNA sottoposto a *splicing* alternativo che viene tradotto in diverse isoforme di caspasi-8. Le isoforme più comuni sono caspasi-8a e caspasi-8b [Stupack, 2013]. La caspasi-8a è una proteina di 55.7 kDa formata da 496 amminoacidi, mentre la caspasi-8b è costituita da 479 amminoacidi ed ha peso molecolare di 53.7 kDa. Entrambe sono espresse in modo ubiquitario e costituiscono le isoforme complete ed attive che mediano l'apoptosi. Altre isoforme come c-FLIP e caspasi-8L (quest'ultima prodotta da *splicing* alternativo) hanno funzione anti-apoptotica, agendo da inibitori dell'attivazione della caspasi-8.

Studi recenti mostrano che caspasi 8 possiede altre funzioni di natura non-apoptotica. Ad esempio, caspasi 8 gioca un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi delle cellule T periferiche attraverso la regolazione della produzione di IL-2, controllando in questo modo la proliferazione dei linfociti T. Inoltre, caspasi 8 è coinvolta nel controllo del differenziamento e proliferazione delle cellule B, delle cellule NK e dei precursori ematopoietici [Algeciras-Schimnich et al., 2002; Launey et al., 2005].

La localizzazione sub-cellulare di caspasi 8 in forma attiva può determinare il suo ruolo nel controllo della proliferazione e morte cellulare. Caspasi 8 si rivela importante anche nell'attivazione della via NF-kB attraverso il TCR, nel *clustering* e internalizzazione di CD95 e nella sopravvivenza delle cellule endoteliali. Durante l'attivazione delle cellule T, segrega nella membrana assieme a c-FLIPL e alcuni regolatori di NF-kB [Misra et al., 2007].

E' stato dimostrato che caspasi 8 può promuovere la motilità, l'adesione e la migrazione delle cellule tumorali e la metastasi [Senft et al., 2007; Finlay e Vuori, 2007; Barbero et al., 2009]. Esperimenti condotti sui topi *knock out* per caspasi 8 hanno dimostrato il ruolo cruciale di questa proteasi nelle prime fasi di sviluppo embrionale, infatti questi animali muoiono nell'utero dopo solo 12.5 giorni a causa di difetti nello sviluppo del tessuto muscolare, nel sistema vascolare e nella formazione del tubo neurale [Varfolomeev et al., 1998]. Questi dati indicano che l'attività costitutiva di caspasi 8 è rilevante per la normale fisiologia cellulare [Fulda, 2009]. Alterazioni di questa importante proteina portano quindi a disfunzioni patologiche.

### **3.3 Inattivazione di caspasi 8 nel cancro**

Una caratteristica peculiare delle cellule tumorali è la loro resistenza all'apoptosi in risposta ai stimoli apoptotici [Hanahan et al., 2000]. Un meccanismo potenziale di evasione dall'apoptosi è rappresentato dall'inattivazione di caspasi 8 mediata da controllo genetico ed epigenetico, da splicing alternativo oppure da modifiche post-traduzionali. Per quanto riguarda i meccanismi di controllo genetico, sono state identificate alcune mutazioni di caspasi 8 in alcuni cancri, come ad esempio il cancro al colon-retto e al fegato oppure carcinomi della testa e del collo [Kim et al., 2003; Soung et al., 2005; Mandruzzato et al., 1997], anche se con bassa frequenza. Tali mutazioni sono dominanti-negative e impediscono il reclutamento della forma fisiologica di caspasi 8 ai domini dei recettori di morte, prevenendo la morte per apoptosi. Inoltre, delezioni omozigoti od eterozigoti di caspasi 8 sono state riscontrate in alcuni tipi di tumori, come ad esempio il neuroblastoma [Kim et al., 2003; Mandruzzato et al., 1997].

In molti tipi di tumore, l'espressione di caspasi 8 può essere aumentata mediante ipermetilazione delle sequenze regolatorie del gene che codifica per caspasi 8, tra questi il neuroblastoma, il medulloblastoma, il glioblastoma, il tumore di Ewing, il retinoblastoma, il rhabdomiosarcoma o il carcinoma polmonare [Teitz et al., 2000; Riley et al., 2013]. Lo stato di metilazione di questa sequenza genica, che mappa tra l'esone 3 e l'introne 3, è stato dimostrato correlare con l'espressione di

caspasi 8 in diverse linee tumorali e anche in cellule tumorali primarie. In modo interessante, nel neuroblastoma è stata riscontrata la metilazione concomitante di caspasi 8 e FLIP, indicando la presenza di un meccanismo di silenziamento epigenetico [Van Noesel et al., 2003].

Inoltre, la funzione di caspasi 8 può essere aumentata mediante l'espressione di caspasi 8L, quest'ultima isoforma è a sua volta regolata mediante splicing alternativo, per esempio nelle leucemie e nel neuroblastoma [Miller et al., 2006; Mohr et al., 2005].

### **3.4 Caspasi 8 e SFK**

Varie evidenze sperimentali indicano che lo stato di fosforilazione di particolari substrati è un requisito importante per il processo apoptotico indotto dai recettori di morte. Le SFK sono state riportate in letteratura come modulatrici del signaling mediato dal recettore Fas ed è stato dimostrato inoltre che un'espressione difettiva della tirosin-fosfatasi SHP-1, in cellule linfoidi, blocca l'apoptosi Fas-mediata [Cursi et al., 2006].

La caspasi-8, fra i possibili target proteici, è stata identificata come substrato delle Src, le quali sono in grado di fosforilare la Tyr380 della procaspasi 8b che è posta nella regione *linker*, che separa la subunità grande p18 dalla piccola p11, prevenendo la sua attivazione. La fosforilazione modula l'attività della caspasi, impedendole di svolgere la sua funzione proapoptotica in seguito alla stimolazione del recettore Fas. La fosforilazione della caspasi-8 in Tyr380 può essere vista come un nuovo meccanismo di soppressione dell'apoptosi adottato dalle cellule tumorali, dato che in alcuni tipi di neoplasie, come nel cancro al colon, l'attività delle Src è patologicamente "up-regolata" [Cursi et al., 2006].

Studi effettuati sui neutrofilii indicano che, anche in questo caso, l'apoptosi può essere regolata in modo rapido, dinamico e post-trascrizionale attraverso la fosforilazione di residui tirosinici della caspasi-8. Infatti è stato dimostrato che l'attività della caspasi-8a è inibita dalla fosforilazione, da parte della tirosin-chinasi Lyn, di due residui tirosinici: Tyr397 e Tyr465. La tirosina 397 corrisponde al residuo Tyr380 dell'isoforma b ed è posta nella regione *linker* fra

le due subunità; la tirosina 465 è presente invece nella subunità p11. Lyn è quindi in grado di fosforilare la caspasi-8, ridurne l'attività ed inibire l'apoptosi nei neutrofilo.

Studi di mutagenesi hanno inoltre evidenziato l'importanza di un terzo residuo amminoacidico, la tirosina 310 della caspasi-8a, che è situata nel prodominio, in corrispondenza del sito di binding per la tirosin-fosfatasi SHP-1 (con motivo caratteristico YXXL). La mutazione Y310F ha effetto antiapoptotico, perché impedisce l'interazione di SHP-1 con la caspasi-8. Questa fosfatasi, infatti, è responsabile della defosforilazione dei residui 397 e 465, con conseguente aumento dell'attività caspasi e incremento dell'apoptosi [Jia et al., 2008].

#### **4 - PROTEIN FOSFATASI-2A (PP2A)**

Fosforilazione e defosforilazione proteica sono degli eventi fondamentali della cellula mediati rispettivamente da chinasi e fosfatasi, che regolano una grande quantità di funzioni come la crescita, la divisione, l'adesione e la motilità cellulare [Soulsby e Bennett, 2009]. Così come è possibile suddividere le protein chinasi in tirosin chinasi e serin/treonin chinasi [Manning et al., 2002], allo stesso modo le fosfatasi possono essere suddivise, in base alla struttura e alla specificità di substrato, in protein tirosin fosfatasi (PTPs) e protein serina/treonina fosfatasi (PSPs).

Nonostante sia le PTPs che le PSPs catalizzino una reazione di defosforilazione, i meccanismi che esse utilizzano sono differenti, ed è stata proprio la comprensione di questa diversità del meccanismo catalitico e dei cambiamenti conformazionali nella struttura delle fosfatasi che ha permesso di sviluppare nuovi potenti e selettivi inibitori.

##### **4.1 Serina/treonina protein-fosfatasi**

Si pensa che l'intera sequenza del genoma umano contenga 518 protein chinasi putative [Shi, 2009] che possono essere classificate in due famiglie: 90 tirosin (Tyr) chinasi (PTKs) e 428 serina/threonina (Ser/Thr) chinasi (PSKs). L'elevata

specificità del segnale, e la natura reversibile della fosforilazione sembra suggerire che ci sia un numero simile di protein fosfatasi nel genoma umano. Sorprendentemente comunque ci sono solo 107 protein fosfatasi tirosiniche (Tyr) putative (PTPs) [Alonso et al., 2004] e addirittura le protein fosfatasi Ser/Thr, denominate (PSPs) sono circa una trentina.

La superfamiglia delle PSPs comprende 3 famiglie: le (PPPs) fosfoprotein fosfatasi, le (PPMs) cioè le protein fosfatasi metallo dipendenti, e le protein fosfatasi basate sull'aspartato, rappresentate dalle FCP/SCP.

Per molti membri della famiglia delle PPPs, la subunità catalitica associa con una grande varietà di subunità regolatorie. I membri maggiormente rappresentativi della famiglia delle PPPs sono: protein fosfatasi-1 (PP1), protein fosfatasi-2A (PP2A), protein fosfatasi-2B (PP2B), protein fosfatasi-4 (PP4), protein fosfatasi-5 (PP5), protein fosfatasi-6 (PP6), e protein fosfatasi-7 (PP7).

La famiglia delle PPM comprende protein fosfatasi, la cui attività è legata agli ioni  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$ , come per esempio la PP2C e la piruvato fosfatasi deidrogenasi. In contrasto con le PPPs, le PPMs non hanno una subunità regolatoria ma contengono invece dei domini in più e hanno una sequenza motivo molto conservata, che potrebbe essere il motivo della specificità dei substrati. Per entrambe le famiglie PPPs e PPMs, gli ioni metallici fungono da catalizzatori e giocano un ruolo fondamentale nell'attivazione della molecola d'acqua per la reazione di defosforilazione, invece le FCP/SCP usano un meccanismo aspartato-dipendente. L'unico substrato conosciuto delle FCP/SCP è il dominio C-terminale dell'RNA polimerasi II, la quale contiene una zona che si ripete formata da un eptapeptide ricco in residui serinici.

Durante gli ultimi vent'anni di ricerca, sono stati raccolti molti dati riguardo le funzioni svolte dalle PSPs nella cellula. Ultimamente è stata rivolta maggiore attenzione alla caratterizzazione del ruolo funzionale delle tre maggiori famiglie che compongono le PSPs [Shi, 2009], in particolar modo, numerosi lavori hanno studiato il ruolo assunto da PP2A nell'omeostasi cellulare.

## **4.2 Struttura di PP2A**

Con il termine protein fosfatasi-2A (PP2A), si identifica un numeroso gruppo di

enzimi oligomerici che rappresentano in alcune cellule più dell'1% della totalità degli enzimi, e assieme alla PP1 sono responsabili di oltre il 90% delle attività svolte dalle PSPs nella cellula [Slupe et al., 2011].

La struttura degli enzimi PP2A presenta un nucleo enzimatico detto PP2AD, e più subunità regolatorie B variabili.

Il nucleo enzimatico PP2A<sub>D</sub> consiste di:

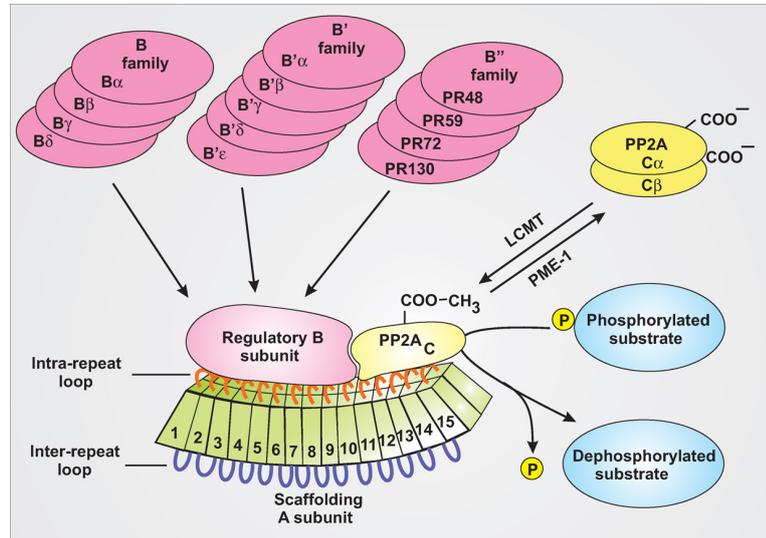
- una subunità strutturale (scaffold), conosciuta anche con il nome di subunità A o PR65, che contiene 15 ripetizioni tandem HEAT (Hunting-Elongation-A subunit-TOR) per un totale di 39 aminoacidi, i quali formano una struttura allungata a forma di ferro di cavallo [Groves et al. 1999]. Ogni ripetizione HEAT è composta da un paio di  $\alpha$ -eliche antiparallele. 15 sequenze di *loop* tra le eliche, tra loro contigue, formano una cresta, analisi strutturali rivelano che la subunità catalitica riconosce la zona conservata della cresta a livello delle ripetizioni HEAT 11-15 [Xing et al., 2006; Shi, 2009];
- una subunità catalitica detta PP2A<sub>C</sub> che comprende *loops* proteici connessi a due foglietti  $\beta$  centrali. In questi *loops* sono presenti sei residui altamente conservati: Asp57, His59, Asp85, Asn117, His167 e His241 [Guo et al., 2014].

Sia la subunità strutturale (scaffold) che la subunità catalitica esistono in 2 isoforme,  $\alpha$  e  $\beta$  con l'isoforma  $\alpha$  dieci volte più abbondante della  $\beta$  [Shi, 2009].

La subunità regolatoria di PP2A è divisa in 4 famiglie: la B o B55 o PR55, la B' (B56 o PR61), B'' (PR48, PR72, PR130), B''' (PR93, PR110). Ciascuna famiglia è composta da un minimo di due fino a un massimo di cinque isoforme, le quali sono codificate da geni diversi; alcune isoforme hanno varianti diverse derivate da *splicing* alternativi, per esempio la famiglia B' esiste in cinque isoforme diverse,  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$   $\delta$  ed  $\epsilon$ , l'isoforma umana B' $\gamma$  ha a sua volta tre varianti di *splicing*,  $\gamma$  1  $\gamma$ 2  $\gamma$ 3.

Ad eccezione delle subunità della famiglia B''', è stato dimostrato che tutte le altre subunità appartenenti alle altre famiglie legano direttamente il nucleo enzimatico di PP2A. Sebbene altamente conservate all'interno della stessa famiglia, queste unità regolatorie condividono piccole sequenze simili tra famiglie diverse, e il loro livello di espressione varia molto in funzione del tessuto e delle

cellule in cui si trovano. Quando il nucleo enzimatico di PP2A interagisce con una subunità regolatoria variabile, si trasforma in un oloenzima [Shi, 2009, Chen et al. 2013; Perrotti e Neviani, 2013; Janssens e Goris, 2001; Westermarck e Hahn, 2008] (Figura 10).



**Figura 10. Struttura e assemblaggio dell'oloenzima protein fosfatasi-2A (PP2A).**

La forma attiva di PP2A è data dall'unione delle subunità, catalitica e scaffold, alla subunità regolatoria per formare l'oloenzima eterotrimerico, la sua struttura misura 90x90x70 Å<sup>3</sup>. (Cell Signalling Biology 2014).

### 4.3 Ruolo fisiologico di PP2A

L'attività delle protein fosfatasi che regola il metabolismo è attribuita a due tipi di protein fosfatasi: il tipo 1 rappresentato da PP1, e il tipo 2 rappresentato da PP2A, PP2B e da PP2C. PP2A ricopre un ruolo molto importante nella crescita, nella proliferazione e nella morte cellulare, nella mobilità della cellula, nella dinamica del citoscheletro, nel controllo del ciclo cellulare, e nella regolazione di numerose vie di segnale e sembra essere anche un importante oncosoppressore [Shi, 2009; Mumby, 2007; Christensen et al. 2011; Perrotti e Neviani, 2013].

La sua azione principale riguarda comunque la regolazione del ciclo cellulare. Il coinvolgimento di questo enzima nella regolazione della transizione dalla fase G<sub>2</sub> alla fase M fu inizialmente suggerito dall'uso di acido okadaico (AO), una tossina naturale ricavata dai molluschi bivalvi e capace di inibire selettivamente le fosfatasi della famiglia PPP, in particolare agisce su PP2A a concentrazioni dell'ordine del nanomolare [Shi 2009]. Studi condotti sugli ovociti di stella

marina portano alla convinzione che PP2A è implicata nel mantenere l'MPF (M-phase Promoting Factor) nella sua forma attiva, prevenendo l'inizio della mitosi [Zolnierowicz, 2000].

È stato dimostrato che PP2A *in vitro* può reprimere la fosforilazione e l'attivazione di CDC25 fosfatasi che agisce su p34cdc2/ciclina B, rafforzando l'ipotesi che PP2A giochi un ruolo fondamentale nella regolazione dell'entrata in mitosi. È stato dimostrato anche che PP2A può avere un ruolo peculiare nella transizione dalla fase G1 alla fase S: infatti la subunità PR59 probabilmente indirizza PP2A a defosforilare p107, una proteina Rb (Retino-Blastoma) che regola il ciclo cellulare, in risposta a stimoli che causano l'arresto della fase G1 (esempio radiazioni UV); per questo le subunità regolatorie appartenenti la famiglia B" potrebbero essere quelle coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare al livello G1/S. Inoltre PR72 può reclutare CDC6, uno starter della replicazione, il che suggerisce che questa famiglia di subunità sia coinvolta nelle fasi iniziali della replicazione del DNA [Roberts et al. 2010; Perrotti e Neviani, 2013; Janssens e Goris, 2001].

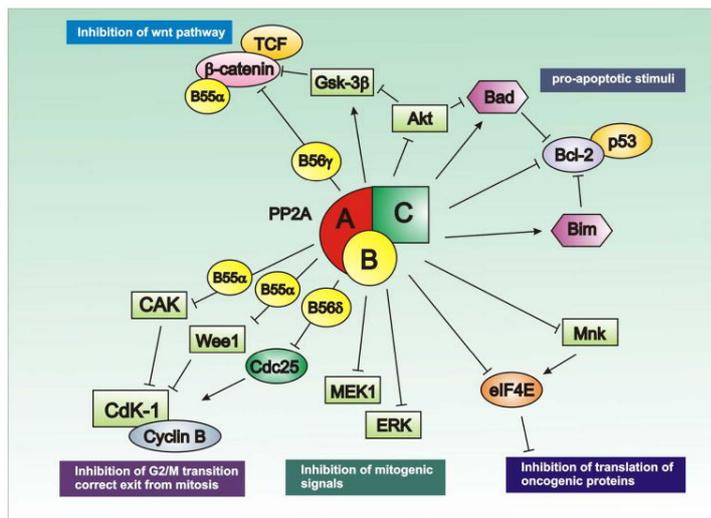
La trasduzione dei segnali è una caratteristica chiave nella sopravvivenza e nella crescita cellulare, le variazioni nel metabolismo sono spesso eseguite da complesse reti di segnali fosforilativi reversibili, il che significa che sono implicate sia le chinasi, sia le fosfatasi, quest'ultima categoria comprende in larga parte la PP2A. È importante notare che PP2A non solo defosforila i substrati chinasi, ma agisce sulle chinasi stesse. Di contro anche l'attività di PP2A può essere regolata dalle chinasi; nel caso di PP2A, la fosforilazione porta alla inattivazione dell'enzima. Infatti è stato dimostrato che una chinasi, la quale è regolata essa stessa da un meccanismo fosforilativo, può interagire direttamente con una fosfatasi, per cui può diventare un substrato (o viceversa); questo meccanismo è conosciuto come via della "segnalazione a moduli" ("signaling modules" pathway). In questo modo le fosfatasi e la chinasi possono regularsi a vicenda. Un esempio di questo meccanismo può essere la CKIIa (Casein Kinase IIa), che interagisce con PP2A<sub>D</sub> attraverso la subunità C nelle cellule quiescenti, e che stimola l'attività della PP2A<sub>D</sub> verso la MEC1 Raf-fosforilata; questo porta all'attivazione di Raf, che separa il complesso formato da CKIIA e PP2A<sub>D</sub> e

come conseguenza viene attivata la via MAPK [Janssens e Goris, 2001].

Nel complesso PP2A modula l'attività di molte altre chinasi, sia *in vivo* che *in vitro*, per esempio ERK, MAPK, PKA, PKB, PKC, Cdk, come dimostrano i test con PP2A in presenza e in assenza del suo inibitore AO [Janssens e Goris, 2001].

È stato inoltre dimostrato che PP2A può agire non solo come una Ser/Thr fosfatasi, ma anche come una Tyr-fosfatasi (PTP), perfino a bassi livelli. È interessante come questa attività PTPasica sia indipendente dall'attività PSPasica, dato che può essere regolata da una specifica proteina chiamata PTPA (PTPase activator) [Guo et al., 2014].

La PP2A è quindi implicata in molteplici vie regolatorie intracellulari, di seguito sono illustrate alcune delle principali vie di segnale in cui la sua attività si dimostra cruciale (Figura 10).



**Figura 10. Rappresentazione schematica di alcune vie metaboliche regolate da PP2A.**

(Lancet Oncol. May 2013;14(6):e229-e238).

## 1. Via di segnale delle MAPK

Una delle principali funzioni di PP2A è la regolazione della via MAPK. La via MAPK è il mezzo con cui molte cellule promuovono l'inizio della divisione cellulare e rappresenta una via estremamente complessa in cui sono implicate molte proteine. PP2A funziona come regolatore negativo e positivo del segnale MAPK, a seconda della subunità regolatoria coinvolte e del substrato interessato. Ad esempio, PP2A agisce negativamente

attraverso la defosforilazione di MEK ed ERK [Roberts et al., 2010]. Al contrario, la defosforilazione di KSR1 (Ser329) e Raf-1 (Ser259) da parte del complesso PP2A-B55 $\alpha$ , aumenta la loro traslocazione in membrana e la loro attività chinastica [Ory et al., 2003].

## 2. **Via di sopravvivenza PI3K-Akt**

La protein chinasi Akt (protein kinase B) è in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare poiché tra i suoi target proteici, sia diretti che indiretti, figurano diverse proteine coinvolte nel processo apoptotico. Il segnale di sopravvivenza cellulare che viene trasmesso a seguito dell'attivazione di Akt si esplica attraverso una duplice via: l'inattivazione di segnali pro-apoptotici e viceversa, l'attivazione di segnali anti-apoptotici. Akt, infatti, esercita parte della sua attività anti-apoptotica prevenendo il rilascio del citocromo c dai mitocondri mediante fosforilazione e conseguente inattivazione del fattore pro-apoptotico BAD e della caspasi-9 [Thompson e Thompson, 2004].

In linea con il suo ruolo di soppressore tumorale, PP2A possiede attività pro-apoptotica in virtù della sua abilità di regolare negativamente la via di PI3K/Akt attraverso defosforilazione diretta di Akt [Janssens e Rebollo, 2012], l'inattivazione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e l'attivazione dei fattori pro-apoptotici BAD e Bim. In particolare, la diretta inattivazione di Akt e la defosforilazione di BAD determinate da PP2A, hanno come conseguenza l'attivazione e traslocazione di BAD alla membrana mitocondriale dove quest'ultimo lega ed inibisce Bcl-2.

## 3. **Via di segnale Wnt/ $\beta$ -catenina**

La  $\beta$ -catenina è una subunità del complesso proteico della caderina ed è il punto centrale della via Wnt/ $\beta$ -catenina, associata alla sopravvivenza cellulare. È codificata dal gene CTNNB1. Fisiologicamente, in assenza del ligando Wnt, la  $\beta$ -catenina interagisce con un complesso proteico formato da APC, AXIN1, AXIN2, PP2A e GSK-3 $\beta$ . Quest'ultimo fosforila i residui terminali di serina e treonina della  $\beta$ -catenina e ne provoca l'ubiquitinazione con la conseguente degradazione tramite il proteasoma.

In presenza del ligando Wnt che interagisce con il recettore di membrana Frizzled, invece, il complesso proteico è inibito e la  $\beta$ -catenina non viene degradata. Quindi essa entra nel nucleo e interagisce con molti fattori trascrizionali tra cui quelli della famiglia TCF(T-cell factor)/LEF(lymphoid enhancing factor), portando all'attivazione di geni responsivi della via Wnt. In generale l'attivazione della  $\beta$ -catenina innesca meccanismi di crescita e resistenza all'apoptosi attivando il gene c-MYC e la ciclina D1 [Perrotti e Neviani, 2013].

PP2A quindi ha un ruolo importante anche nella regolazione della via Wnt nello sviluppo embrionale, nella crescita cellulare, e nella sopravvivenza e nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali. Sebbene i complessi di PP2A abbiano dimostrato effetti sia positivi che negativi sulla via Wnt, questa fosfatasi è principalmente considerata un regolatore negativo ed una sua inibizione porta ad un aumento della trascrizione genica dipendente da  $\beta$ -catenina. Inoltre, PP2A agisce su GSK-3 $\beta$ , il regolatore negativo di  $\beta$ -catenina, sia attraverso l'inibizione di Akt, chinasi che a sua volta regola GSK-3 $\beta$  [Perrotti e Neviani, 2013].

#### **4.4 Regolazione di PP2A**

Si possono assemblare numerosi oloenzimi dimerici e trimerici di PP2A, questo significa che le possibilità di regolazione sono molte e comprendono localizzazione, specificità di substrato e affinità verso il substrato, che possono essere influenzate dalla presenza o dall'assenza di subunità addizionali. Per quel che riguarda le modificazioni post-traduzionali, due sono le più ricorrenti: la fosforilazione e la metilazione [Perrotti e Neviani, 2013; Janssens e Goris, 2001]. La fosforilazione avviene a livello del residuo Tyr307, che è localizzato al lato C-terminale di PP2Ac, e risulta nell'inattivazione dell'enzima. Questo tipo di regolazione è reso possibile grazie alle tirosin-chinasi pp60v-src, pp56Lck, EGFR (epidermal growth factor) e ai recettori insulinici, ma in condizioni normali PP2A si riattiva rapidamente tramite auto-defosforilazione.

L'aumentata fosforilazione di PP2A nelle cellule dovuta a fattori di crescita e trasformazioni cellulari implica una regolazione in negativo di PP2A; la

concomitante transiente inattivazione di PP2A potrebbe essere un fattore accelerante durante la trasmissione del segnale nella cascata chinasi. Di recente, Le Guelte e collaboratori hanno dimostrato che le SFK sono responsabili della fosforilazione tirosinica, e quindi dell'inattivazione, di PP2A [Le Guelte et al. 2012]. La parte C-terminale di PP2Ac contiene non solo un sito di fosforilazione ma anche uno di metilazione che coinvolge il residuo di Leu309. La metilazione è mediata da un enzima chiamato LCMT-I (Leucine-Carboxy Methyl Transferase I), ma le conseguenze della metilazione sono ancora poco chiare, anche se alcuni autori riportano un aumento dell'attività compreso tra il 31 e il 54% quando la subunità catalitica di PP2A purificata da cellule di cancro della mammella viene esposta ad un mix di metiltransferasi [Janssens e Goris, 2001; Perrotti e Neviani, 2013].

### **Inibitori e attivatori di PP2A**

Dato che PP2A riveste un ruolo cruciale nella regolazione positiva o negativa di segnali mitogeni o apoptotici, è stato ipotizzato un suo coinvolgimento nello sviluppo e nella progressione tumorale. Nelle cellule trasformate, l'inattivazione di PP2A e, pertanto, la perdita della sua attività di soppressore tumorale, può essere non solo una conseguenza di alterazioni genetiche o di anomalie nell'espressione di una specifica subunità, ma potrebbe anche derivare da un'attivazione aberrante delle vie di trasduzione del segnale che portano a modificazioni post-traduzionali della subunità catalitica di PP2A. L'attività fosfatase della PP2A può essere modulata anche dall'interazione con inibitori/attivatori endogeni; una loro espressione aberrante potrebbe essere la causa di stati patologici.

#### **I2PP2A/SET:**

L'espressione di pp32 (I1PP2A) e SET (I2PP2A), due potenti inibitori di PP2A, sopprime l'attività fosfatase di tutte le isoforme di protein fosfatasi-2A, attraverso legame diretto con la subunità catalitica. L'inibitore fisiologico SET (Suval 3-9, Enhancer di zeste, Trithorax), noto anche come TAF-I $\beta$  (Template Activating Factor I $\beta$ ) o I2PP2A (una forma troncata della proteina) è espresso in vari tessuti, esiste in due isoforme di *splicing*, una composta da 290 aminoacidi

(I2PP2A/SET $\alpha$ ) e un'altra formata da 277 aminoacidi (I2PP2A/SET $\beta$ ) e mostra un peso molecolare di 39 kDa. I2PP2A/SET [Janssens e Goris, 2001]. Nelle cellule B-normali la forma predominante è la  $\beta$ , ma nelle cellule di LLC-B entrambe le forme sono espresse a livelli simili [Christensen et al., 2011].

SET interviene attivamente in vari processi: la replicazione del DNA, il rimodellamento della cromatina, la trascrizione genica, il differenziamento, la regolazione del ciclo cellulare, la fosforilazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici, la diffusione e motilità delle cellule. Questa proteina è localizzata principalmente nel nucleo e qui assume diverse funzioni, tra cui l'inibizione della DNAsi e l'acetilazione degli istoni, quindi la localizzazione nucleare della proteina stessa si rivela importante al fine di evitare danni al DNA [Arnaud et al., 2011]. Infatti, SET sembra facilitare la trascrizione, probabilmente perché può invertire l'assemblaggio del nucleosoma e così facendo aumentare l'accessibilità al DNA. Inoltre la sua espressione è elevata nelle cellule in rapida divisione, e bassa in quelle quiescenti. Questi fattori rafforzano l'idea che I2PP2A/SET possa avere un ruolo importante nell'agevolare la crescita e la proliferazione cellulare e che possa interagire con vie di segnale che promuovono l'oncogenesi e l'istaurarsi di metastasi [Perrotti e Neviani, 2013; Janssens e Goris, 2001].

Da un punto di vista clinico, SET sembra essere importante perché la sua sovra-espressione è frequente nella leucemia mieloide acuta e cronica e nella leucemia linfatica cronica [Christensen et al., 2011]. Ad esempio nella leucemia mieloide cronica l'attività chinasi di Bcr/Abl promuove l'espressione di SET che porta ad un'inibizione di PP2A; PP2A, quando attivo, defosforila SHP-1 che a sua volta esplica la sua azione Tirosin-fosfatasi su Bcr/Abl. La sovra-espressione di SET porta quindi ad una attivazione continua di Bcr/Abl ed a tutte le vie di sopravvivenza cellulare da esso regolate (Akt, BAD, ERK 1/2) [Westermarck et al.; 2008].

Nella LLC-B è inoltre considerato fattore di decorso infausto della malattia ed è stato inoltre dimostrato che I2PP2A/SET può direttamente inibire l'attività di PP2A, quando si trova delocalizzato nel citoplasma, grazie all'interazione della sua regione N-terminale (AA 25-119) con la subunità catalitica PP2Ac [Christensen et al., 2011].

CIP2A: Un altro inibitore della PP2A che determina proliferazione cellulare è CIP2A (Cancerous Inhibitor of PP2A); una proteina citoplasmatica di 90 kDa. CIP2A lega direttamente il complesso c-MYC-PP2A impedendone la defosforilazione in Ser62 e la successiva degradazione; MYC è un fattore di trascrizione pleiotropico che è collegato a diverse funzioni cellulari come la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione, la crescita, la differenziazione e il metabolismo. L'inibizione di CIP2A è una possibile strategia per indurre degradazione mirata dei c-MYC nelle cellule tumorali.

ACIDO OKADAICO: L'acido okadaico (AO) è un composto lipofilo naturale ed è un potente inibitore delle protein serina/treonina fosfatasi, PP2A e PP1, con valori di IC50 rispettivamente di 0.2 nM e 20 nM. Comparazioni strutturali hanno rivelato che la tasca idrofobica della subunità C della PP2A che accoglie l'AO è molto meno formata nella PP1 [Xing et al., 2006]; questo può spiegare le differenze osservate nell'inibizione di queste proteine. AO inibisce potentemente anche altre fosfatasi, come PP4 e PP5. Inoltre AO è anche in grado di inibire, anche se in misura molto minore, altre fosfatasi, come PP2B o PP7 pur non dimostrando alcun effetto sulle PPM (proteina fosfatasi  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ -dipendente), o le tirosin-fosfatasi [Medina et al., 2013].

FINGOLIMOD: Conosciuto anche come FTY720, è un analogo strutturale della sfingosina che è stato sviluppato a partire dalla miriocina, un metabolita fungino. È stato dimostrato che miriocina possiede una potente attività immunosoppressiva ed è stata utilizzata in seguito come composto di partenza per lo sviluppo di nuovi composti immunosoppressori con una maggiore efficacia e minori effetti collaterali, soprattutto a carico dell'apparato gastrointestinale. La molecola risultante FTY720 (2-ammino-2-(2-[4-ottilfenil]etil)-1,3-propandiolo), presenta un meccanismo d'azione diverso rispetto a miriocina; mentre essa inibisce la palmitoil transferasi (coinvolta nella biosintesi degli sfingolipidi), FTY720 esercita i suoi effetti immunosoppressivi tramite modulazione dei recettori per sfingosina 1-fosfato (S1P) poiché, in forma fosforilata, rappresenta il suo analogo strutturale.

FTY720 ha mostrato potente attività immunosoppressiva e bassa tossicità, questo farmaco è stato approvato nel 2011 dalla FDA (US Food and Drug Administration) per la terapia nelle forme recidive di sclerosi multipla (SM), grazie anche al grande vantaggio di poter essere somministrabile per via orale [Pitman et al., 2012]. Dopo la dimostrazione che FTY720 può indurre apoptosi nei linfociti periferici, si è iniziato ad indagare circa il suo effetto di induttore di apoptosi e quindi anti-tumorale. Sembra che, da un punto di vista funzionale e meccanicistico, le proprietà immunosoppressive e anti-tumorali di FTY720 possano essere indipendenti; gli effetti anti-tumorali di fingolimod sono generalmente osservati a dosi più elevate (5-10mg/kg/day) di quanto richiesto per indurre linfopenia (1mg/kg/day), questo ha portato alla convinzione che possa agire con due differenti meccanismi di azione. È molto importante considerare che *in vivo*, l'effetto immunosoppressivo di FTY720 è dovuto alla sua forma fosforilata (FTY720-P), mentre gli effetti pro-apoptotici sono dovuti alla sua forma non fosforilata. La fosforilazione è mediata dall'enzima sfingosina chinasi 2 (SK2) che è anche responsabile della fosforilazione di sfingosina a sfingosina 1 fosfato (S1P). FTY720-P induce linfopenia tramite la sua azione su quattro dei cinque recettori G accoppiati specifici per S1P (GPCR), chiamati S1PR1-5. In condizioni fisiologiche, S1P risulta poco espressa nelle cellule, ma fattori esterni come ad esempio, i fattori di crescita, possono aumentare la sua espressione portando ad una rapida attivazione dell'enzima SK1. Si è osservato che S1P può agire principalmente in due modi: all'interno della cellula come secondo messaggero, o all'esterno in modo autocrino/paracrino grazie ai S1PR. L'espressione di S1PR1 sui linfociti gioca un ruolo fondamentale nel controllo del ricircolo dei linfociti, poiché è strettamente necessaria per l'uscita dei timociti dal timo e per l'uscita delle cellule B e T dai tessuti linfoidei. Una caratteristica interessante di questi recettori è che, mentre S1PR1 promuove l'uscita dei linfociti dagli organi linfoidei secondari, S1PR2 quando stimolati da fattori come IGF-I, hanno un effetto esattamente antagonista. FTY720, dopo somministrazione prolungata, diventa un "antagonista funzionale" per S1PRs, e soprattutto per S1PR1. In particolare, FTY720-P-attivo, quando viene internalizzato, è degradato

attraverso il proteosoma; questo porta ad una riduzione dell'espressione superficiale di S1PR1.

Considerando invece, la funzione pro-apoptotica, i meccanismi che mediano questo effetto di FTY720 non sono ancora stati completamente compresi. Studi sugli effetti di FTY720 sulle vie di sopravvivenza dei linfociti nei linfomi a cellule T hanno mostrato maggiore defosforilazione di Akt, Bad, e chinasi ribosomiale S5 p70, confermando l'attivazione di PP2A da parte di fingolimod. Nella sua forma non fosforilata FTY720 è in grado di indirizzare PP2A, migliorando la sua attività. Tuttavia, il meccanismo molecolare è ancora poco chiaro; test *in vitro* suggeriscono che l'attivazione sia diretta, altri invece, suggeriscono che l'attivazione di PP2A indotta da fingolimod sia mediata dalla regolazione negativa di SET, proteina inibitrice di PP2A che è comunemente sovra-espressa in diverse forme di leucemia [Pitman et al., 2012]. Gli effetti di FTY720 potrebbero quindi essere dovuti alla sua funzione inibitoria nei confronti di SET.

Infine, FTY720 ha come bersaglio molti enzimi della via degli sfingolipidi, in grado di inibire ceramide sintasi, SK1 e S1P liasi. Recenti studi dimostrano come FTY720, mimando il legame delle sfingosine a I2PP2A/SET, interagisca con i residui aminoacidici Lys209 e His122 di quest'ultimo, provocando il suo spiazzamento dal complesso PP2A/SET e portando quindi ad una riattivazione dell'attività fosfatase di PP2A [Saddoughi et al.; 2013].







## SCOPO DELLA TESI

Per lungo tempo la leucemia linfatica cronica a cellule B (LLC-B) è stata considerata un disordine linfoproliferativo indolente da accumulo di piccoli linfociti, mentre i più recenti progressi scientifici identificano nella LLC-B una malattia dinamica, dal decorso clinico eterogeneo, causata principalmente da uno squilibrio nei normali processi di sopravvivenza e morte cellulare.

I meccanismi di evasione dall'apoptosi riscontrati in tale patologia sono stati ricondotti sia a fattori di natura estrinseca, come quelli provenienti dal microambiente delle cellule LLC-B, sia a fattori intrinseci legati, in particolare, all'anomala espressione di molecole anti-apoptotiche, alle mutazioni somatiche dei geni *IGVH* e alla deregolazione delle vie di segnale trasdotte a partire dal BCR. Molte chinasi agiscono nell'ambito della trasduzione e trasmissione dei segnali di sopravvivenza cellulare, tra le quali Lyn, Syk, Btk, PI3-K, PKC e ERK1/2, chinasi che, nelle cellule LLC-B, mostrano un aumento dell'attività rispetto ai linfociti normali.

I linfociti LLC-B sono caratterizzati da uno stato di fosforilazione basale anomalo che è principalmente attribuibile all'attività della tirosin-chinasi Lyn, la quale, in tale patologia, risulta sovra-espressa, distribuita su tutta la superficie della membrana plasmatica e presente nel citosol come parte di un complesso multiproteico aberrante. La forma citosolica di Lyn mostra un'attivazione costitutiva che causa la fosforilazione di numerose proteine bersaglio ed è responsabile della resistenza delle cellule neoplastiche alla morte per apoptosi.

Poiché i farmaci inibitori di Lyn, come il dasatinib, hanno condotto a risultati contrastanti nel loro impiego nella LLC-B, il nostro scopo è stato quello di identificare i substrati dell'anomala attività di Lyn per meglio comprendere i meccanismi molecolari alla base della resistenza alla morte di questi cloni leucemici, estendere il possibile repertorio dei bersagli farmacologici in questa malattia e infine identificare il contributo di questa Src-chinasi nella patogenesi e progressione della leucemia linfatica cronica.







# 1 - MATERIALI

## 1.1 Anticorpi

L'anticorpo policlonale PARP è stato acquistato da Roche Applied Science (Mannheim, Germany). Gli anticorpi anti-PP2A-C $\alpha$ / $\beta$ , anti-p-PP2A-C $\alpha$ / $\beta$  (Tyr307), anti-I2PP2A/SET, anti-calnessina, anti-caspasi-3, anti-lamina B, anti-LDH, anti-aconitasi sono stati forniti da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Gli anticorpi anti-Lyn, anti-SHP-1, l'anticorpo policlonale anti-procasp8 e l'anticorpo monoclonale anti-fosfo-tirosina (p-Tyr) (clone PY-20) sono stati acquistati da Millipore-Merck (Billerica, MA, USA). L'anticorpo anti-fosfo-Tyr380 procasp8 (anti-p-procasp8), anti-calnessina e anti-PMCA sono di Abcam (Cambridge, UK). Anti-Bid (Human Specific), anti-Akt, anti-p-Atk (Ser473) (p-Akt), anti-Gsk-3 $\beta$ , anti-pGSK-3 $\beta$  (Ser9) sono di Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-citocromo c (cit-c) è stato fornito da BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). L'anticorpo anti- $\beta$ -actina (clone AC-15) è stato acquistato da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

L'anticorpo anti-pTyr396-Lyn è stato fornito da Epitomics (Burlingame, CA, USA). Anti-SHP-1-p-Ser591 è stato procurato da ECM Biosciences (Versailles, KY, USA). Gli anticorpi secondari utilizzati per le rivelazioni anticorpali sono stati acquistati da Calbiochem-Merck (Billerica, MA, USA). L'anticorpo Annexin V-FITC è stato procurato da Bender Medsystem (Vienna, A), l'anti-CD5 PE-Cy5 da Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) e anti-CD19 APC da Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

## 1.2 Prodotti

I cocktails inibitori di fosfatasi 2 e 3 (Pic3), la geldanamicina (GA), la fosfatasi- $\lambda$ , il citrato di sodio, il terreno RPMI 1640, la Poli-L-lisina-Agarosio e i reagenti di uso comune sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Millipore-Merck (Billerica, MA, USA) ha fornito: PP2, SU6656, l'inibitore II di caspasi-8 (z-IETD-fmk), l'inibitore pan-caspasico (z-VAD-fmk) e il kit "Ser/Thr Phosphatase Assay Kit 1(K-R-pT-I-R-R)". Saracatinib è stato fornito da

Selleckchem (Monaco, Germania). Gli *small interfering* RNA (siRNA) per caspasi 8 (Stealth siRNAs HSS141460, HSS141461, HSS141462), il siRNA per Bid (Stealth siRNAs HSS141376, HSS141377, HSS141378) e il siRNA di controllo negativo sono stati procurati da Life Technologies. [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (3000 Ci/mmol - 111 TBq/mmol) è stato acquistato da Perkin Elmer (Little Chalfont, UK). DEAE Sepharose Fast Flow e la colonna di separazione cromatografica Superdex 200 10/300 GL per il sistema fast-performance liquid chromatography (FPLC) sono stati acquistati da GE Healthcare (Freiburg, Germania). “Pierce ECL Western Blotting Substrate”, FBS e le pastiglie d’inibitori proteasici sono stati procurati da Thermo Fisher Scientific. La proteina A-Sefarosio, la proteina G PLUS-Agarosio e dasatinib (monoidrato) sono stati acquistati da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Il kit “Caspase-8 colorimetric assay kit” e il farmaco FTY720 sono stati acquistati da Alexis (Alexis Corporation, Lausen, CH). Ficoll/Hypaque (F/H) è stato preso da Amersham Biosciences (San Francisco, CA, USA). L’acido okadaico (AO) è stato fornito da Adipogen (San Diego, USA). Il kit “Annexin V Apoptosis Detection Kit” è stato fornito da Becton Dickinson. Il “Human B Cell Nucleofector Kit” è stato fornito da AMAXA (Colonia, Germania).

Gli analoghi di Fingolimod (MP01-66, MP04-66, MP06-66, MP07-66) sono stati forniti dal laboratorio di Sintesi Organica del prof. G. Zagotto del Dip.to di Scienze del Farmaco (Università di Padova).

### **1.3 Pazienti**

In questo studio, sono stati analizzati 80 pazienti affetti da LLC-B mai sottoposti ad alcun tipo di terapia, i quali sono stati classificati in base ad alcuni fattori prognostici di tipo clinico e laboratoristico che includono: età, sesso, conta linfocitaria, stadio di Rai, stato mutazionale dei geni *IGVH* ed espressione di ZAP-70 (Tabella II).

I linfociti B dei pazienti in esame e di donatori sani sono stati forniti dal gruppo del prof. G. Semenzato dell’Istituto Veneto di Medicina Molecolare (Padova).

**Tabella II. Caratteristiche cliniche, ematochimiche e molecolari dei pazienti analizzati.**

Paziente n°	Età, anni	Sesso	Stadio Rai*	WBC (/mm <sup>3</sup> )	Linfociti, %	Stato mutazionale†	Espressione Zap-70‡
1	83	F	0	48630	95,2	UM	POS
2	77	M	0	34910	62,7	UM	POS
3	64	M	0	79430	98,5	M	POS
4	56	F	0	109500	97	UM	NEG
5	55	M	0	85150	89	UM	NEG
6	80	M	0	112000	80,8	M	POS
7	88	F	0	50300	63	UM	POS
8	64	M	0	51180	96,8	M	POS
9	83	F	0	48630	95,2	UM	POS
10	77	M	0	34910	62,7	UM	POS
11	64	M	0	79430	98,5	M	POS
12	56	F	0	109500	97	UM	NEG
13	55	M	0	85150	89	UM	NEG
14	80	M	0	112000	80,8	M	POS
15	88	F	0	50300	63	UM	POS
16	64	M	0	51180	96,8	UM	POS
17	66	M	I	121800	92	M	NEG
18	61	M	I	19600	68	M	NEG
19	68	F	I	45150	94,4	M	NEG
20	53	M	I	57110	82,6	UM	NEG
21	66	F	I	61660	92,9	UM	NEG
22	76	M	I	158000	97	M	NEG
23	81	M	I	31010	51,2	M	POS
24	81	F	I	145700	95	UM	POS
25	76	F	I	28080	87	UM	NEG
26	66	F	I	61660	92,9	UM	NEG
27	76	M	I	35140	83,5	UM	NEG
28	63	F	I	57600	93	M	NEG
29	72	F	I	58100	83,9	M	NEG
30	66	M	I	121800	92	M	NEG
31	61	M	I	19600	68	M	NEG
32	68	F	I	45150	94,4	M	NEG
33	53	M	I	57110	82,6	UM	NEG
34	66	F	I	61660	92,9	UM	NEG
35	76	M	I	158000	97	M	NEG
36	81	M	I	31010	51,2	M	POS
37	81	F	I	145700	95	UM	POS
38	76	F	I	28080	87	UM	NEG

Paziente n°	Età, anni	Sesso	Stadio Rai*	WBC (/mm <sup>3</sup> )	Linfociti, %	Stato mutazionale <sup>†</sup>	Espressione Zap-70 <sup>‡</sup>
39	66	F	I	61660	92,9	UM	NEG
40	76	M	I	35140	83,5	UM	NEG
41	63	F	I	57600	93	M	NEG
42	72	F	I	58100	83,9	M	NEG
43	65	F	II	47180	92,6	UM	POS
44	75	M	II	55600	87	UM	POS
45	75	M	II	25290	76	M	NEG
46	63	M	II	74610	89	M	POS
47	65	M	II	99600	91	UM	NEG
48	76	F	II	62110	84	UM	NEG
49	79	F	II	155800	94,5	M	NEG
50	65	F	II	47180	92,6	UM	POS
51	75	M	II	55600	87	UM	POS
52	75	M	II	25290	76	M	NEG
53	63	M	II	74610	89	M	POS
54	65	M	II	99600	91	UM	NEG
55	76	F	II	62110	84	UM	NEG
56	79	F	II	155800	94,5	UM	NEG
57	62	M	III	93290	91,3	M	NEG
58	76	F	III	43290	93,9	M	POS
59	62	M	III	90170	85,5	M	NEG
60	62	M	III	93290	91,3	M	NEG
61	76	F	III	43290	93,9	M	POS
62	62	M	III	90170	85,5	M	NEG
63	75	M	IV	122000	94	UM	NEG
64	78	M	IV	69370	83	UM	NEG
65	71	M	IV	91950	95	UM	POS
66	68	M	IV	65600	89	M	NEG
67	63	M	IV	97970	63	M	POS
68	82	F	IV	26590	91	UM	POS
69	56	F	IV	82520	55	UM	NEG
70	72	M	IV	138060	93,8	M	POS
71	73	M	IV	83530	94	UM	NEG
72	75	M	IV	122000	94	UM	NEG
73	78	M	IV	69370	83	UM	NEG
74	71	M	IV	91950	95	M	POS
75	68	M	IV	65600	89	M	NEG
76	63	M	IV	97970	63	M	POS
77	82	F	IV	26590	91	UM	POS

Paziente n°	Età, anni	Sesso	Stadio Rai*	WBC (/mm <sup>3</sup> )	Linfociti, %	Stato mutazionale <sup>†</sup>	Espressione Zap-70 <sup>‡</sup>
79	72	M	IV	138060	93,8	M	POS
80	73	M	IV	83530	94	UM	NEG

**Abbreviazioni:** WBC, white blood cells (Globuli bianchi); M, maschio; F, femmina; UM, non mutato; M, mutato; NEG, negativo; POS, positivo.

\* Stadiazione secondo Rai [Rai et al., 1975];

<sup>†</sup> Stato mutazionale dei geni IgV<sub>H</sub>: si definisce lo stato con la presenza di SHM in percentuale uguale o superiore al 2% rispetto alla sequenza germline;

<sup>‡</sup> Parametro valutato mediante analisi citofluorimetrica (cut off > 20%).

## 2 - METODICHE GENERALI

### 2.1 Isolamento dei linfociti B da sangue periferico

I linfociti B sono stati isolati dal sangue periferico di pazienti affetti da LLC-B. Le cellule mononucleate sono state ottenute da un prelievo di sangue venoso eparinato, procedendo con una stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H). Questo metodo sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate (linfociti e monociti) rispetto ad altri elementi corpuscolati del sangue. Le cellule mononucleate e le piastrine, che presentano una densità inferiore, si concentrano sopra lo strato di F/H; mentre gli eritrociti e i granulociti si depositano sul fondo della provetta. Le piastrine sono state separate dalle cellule mononucleate mediante lavaggi successivi. Considerando l'alta conta leucocitaria dei pazienti con LLC, il sangue periferico è stato prima diluito in rapporto 1:6 con sodio cloruro 0.9% (soluzione fisiologica) a temperatura ambiente ed agitato delicatamente; poi stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. E' stata poi eseguita una centrifugazione a 900g per 20 minuti a 20°C, senza freno. L'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia F/H è stato aspirato e sottoposto a due lavaggi consecutivi con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 400g per 10 minuti a 20°C (Figura 11, parte superiore). Il fondello è stato risospeso in una quantità appropriata di soluzione fisiologica e le cellule sono state contate nella camera di Burker.

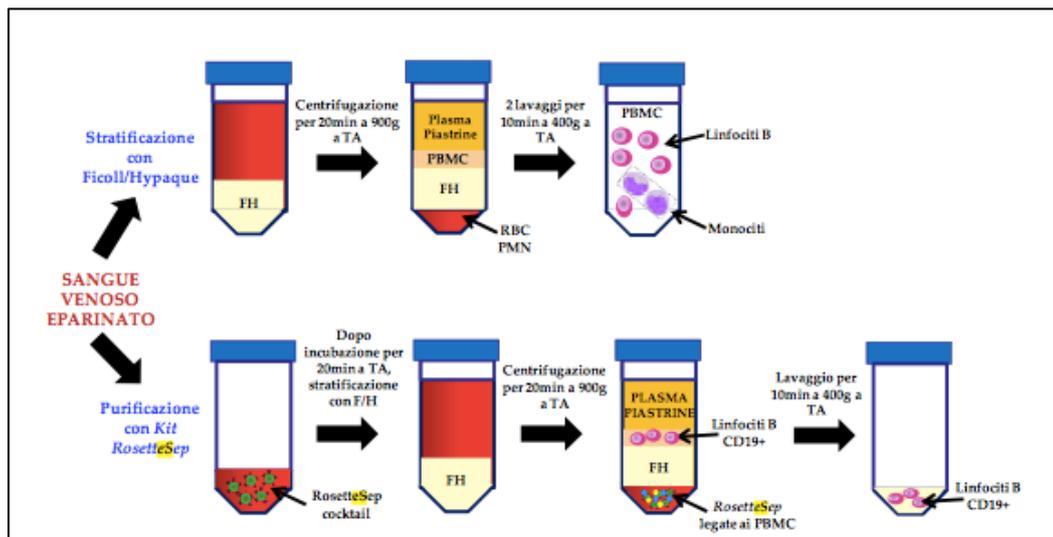
## **2.2 Purificazione dei linfociti B mediante rosettazione con SRBC**

Nella maggioranza dei casi di LLC, la percentuale di cellule B leucemiche era superiore all'85% dei PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) isolati; nei casi in cui la popolazione cellulare presentava una percentuale di linfociti T superiore al 15%, abbiamo effettuato la purificazione dei linfociti B tramite rosettazione con globuli rossi di montone (SRBC) trattati con neuroaminidasi. La rosettazione permette di rimuovere i linfociti T dalle altre cellule mononucleate, sfruttando la loro capacità di legarsi e formare rosette con i SRBC. Questi ultimi, infatti, esprimono sulla loro superficie il recettore specifico per il marcatore CD2 dei linfociti T; il trattamento con neuroaminidasi degli SRBC rende più accessibile il recettore al legame con il CD2. Aliquote da  $25 \times 10^6$  di cellule mononucleate sono state trasferite in un tubo da centrifuga da 10 ml, dove è stato aggiunto 1 ml di SRBC trattati con neuroaminidasi. PBMC e globuli sono stati quindi, incubati a 37°C per 25 minuti, al termine dei quali sono stati centrifugati a 4°C per 10 minuti a 200g senza freno e successivamente sottoposti ad una nuova incubazione a 4°C per 30 minuti. È stato poi aspirato il soprannatante ed è stato aggiunto terreno di coltura RPMI 1640. La miscela è stata risospesa delicatamente, in seguito stratificata sopra la soluzione di F/H e centrifugata a 4°C per 20 minuti a 900g senza freno: i linfociti T circondati dai globuli rossi di montone, definiti "rosette", si depositano sul fondo della provetta, avendo una densità superiore a quella dello strato di F/H, mentre le cellule mononucleate non T (monociti e linfociti B) si concentrano al di sopra dello strato di F/H (Figura). Lo strato presente all'interfaccia, che contiene cellule non T, è stato trasferito in una provetta da 10 ml. Sono stati eseguiti due lavaggi con soluzione fisiologica a 400g a 20°C per 10 minuti con freno e, al termine, le cellule sono state risospese in fisiologica e contate nella camera di Burker.

## **2.3 Purificazione dei linfociti B mediante kit RosetteSep**

Per ottenere i linfociti B normali direttamente dal sangue intero di donatori sani, abbiamo utilizzato il kit RosetteSep (StemCell Technologies), che sfrutta un

cocktail di anticorpi diretti contro antigeni di superficie espressi dalle cellule ematopoietiche (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) e la glicoforina A espressa dagli eritrociti, per selezionare negativamente le cellule B dal sangue intero. Questa miscela di anticorpi si lega alle cellule non B e ai globuli rossi creando delle immunorosette. Ad ogni ml di sangue, ottenuto da *buffy coat*, sono stati aggiunti 50  $\mu$ l di RosetteSep e si è proceduto ad un'incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti. Il campione è stato poi diluito 1:2 con PBS 1X + 2% FBS ed agitato delicatamente; in seguito è stato stratificato su F/H. Si è proceduto, quindi, con una centrifugazione a 900g a temperatura ambiente per 30 minuti cui ha fatto seguito l'aspirazione dell'anello formatosi all'interfaccia F/H contenente le cellule B. Queste ultime sono state risospese in PBS 1X + 2% FBS e centrifugate a 400g per 10 minuti (Figura 11, parte inferiore). Infine, le cellule sono state risospese in PBS 1X e contate.



**Figura 11. Isolamento delle cellule mononucleate da sangue periferico: Stratificazione su Ficoll/Hypaque (pannello superiore).** Le cellule mononucleate sono state isolate dal sangue periferico mediante centrifugazione su gradiente di F/H. Le cellule mononucleate e le piastrine si concentrano sopra lo strato di F/H perché hanno minor densità; al contrario, gli eritrociti (RBC) ed i granulociti (PMN) hanno una densità maggiore rispetto al F/H e si depositano sul fondo della provetta. **Purificazione con Kit RosetteSep (pannello inferiore).** Da sangue intero vengono isolati, per selezione negativa, i linfociti B CD19+. 10 ml di sangue venoso intero sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente (TA) con 500  $\mu$ l di RosetteSep. A seguire, tramite stratificazione su F/H, si ottengono i linfociti B CD19+ che si concentrano subito sopra lo strato di F/H, mentre altre cellule PMN e i globuli rossi (RBC), legati alle rossette, si raccolgono sul fondo della provetta.

## **2.4 Colture cellulari**

I linfociti B isolati dal sangue periferico sono stati risospesi in terreno completo composto di RPMI 1640 + 2% FBS alla concentrazione di  $2 \times 10^6$ /ml e messi in piastre da 12 o da 24 pozzetti. Una volta aggiunti gli inibitori d'interesse oppure gli analoghi di fingolimod, le cellule sono state incubate in un termostato a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO<sub>2</sub> al 5% e raccolte a tempi diversi per la valutazione dell'apoptosi.

## **2.5 Lisato totale e frazionamento subcellulare**

Dalle sospensioni cellulari di LLC-B, sono state prelevate aliquote corrispondenti a  $250 \times 10^3$  e  $500 \times 10^3$  cellule, quindi i campioni sono stati rapidamente lisati in Laemmli buffer, composto da Tris/HCl 0,625 M, pH 6,8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanolo 5%, glicerolo 50%, pironina in tracce con aggiunta di SDS 20% e  $\beta$ -mercaptoetanolo 20%.

Per ottenere le frazioni sub-cellulari invece, i campioni sono stati suddivisi in aliquote da  $15 \times 10^6$  cellule. Ogni aliquota è stata risospesa in 350  $\mu$ l di tampone isotonic costituito da Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, saccarosio 0.25 M, con aggiunta di ortovanadato 1 mM, inibitori proteasici e fosfatasi. I campioni sono stati sonicati e in seguito centrifugati a 900g per 10 minuti e a 10000g per 10 minuti per separare una frazione particolata costituita da cellule non rotte, nuclei, particelle cellulari e mitocondri (I-Par.). Il soprannatante è stato in seguito centrifugato per 30 minuti a 105000g per ottenere la frazione particolata corrispondente ai microsomi e il citosol (II-Par.). La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante metodo di Bradford.

## **2.6 Dosaggio proteico**

La determinazione della concentrazione proteica è stata effettuata con il metodo di Bradford [Bradford, 1976], che permette di dosare con buona sensibilità una quantità di proteine compresa tra 1 e 10  $\mu$ g. Oltre ai campioni da dosare, è stata preparata una curva di taratura basata su concentrazioni crescenti di uno standard proteico, la BSA. Ogni campione viene portato ad un volume di 100  $\mu$ l e vengono

aggiunti 900 µl di reagente Bradford (Coomassie Blue G-250 0,003%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% in etanolo). La lettura allo spettrofotometro è immediata a  $\lambda=595$  nm. Dai valori di assorbanza riportati sulla curva di calibrazione standard, si estrapolano i valori corrispondenti ai campioni in esame.

## **2.7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (SDS/PAGE)**

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide è un metodo largamente impiegato per separare le proteine di una miscela e determinarne il peso molecolare.

Prima di essere caricati sul gel, i lisati cellulari vengono bolliti per 5 minuti in presenza di  $\beta$ -mercaptoetanolo, che scinde i legami disolfuro destabilizzando la struttura terziaria delle proteine, e di SDS. Il dodecilsolfato di sodio (SDS) è un detergente ionico che si lega saldamente alle proteine e ne provoca la denaturazione. In presenza di un eccesso di SDS, per ogni grammo di proteina si legano circa 1,4 grammi di detergente, fornendo alla proteina una quantità di carica negativa costante per unità di massa. Pertanto, durante l'elettroforesi, i complessi proteina-SDS si muovono tutti verso l'anodo e, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, la loro mobilità risulta inversamente proporzionale al peso molecolare. E' possibile determinare il peso molecolare delle proteine in esame, facendo migrare, contemporaneamente al campione, proteine standard di peso molecolare noto. Il gel di poliacrilammide in SDS viene preparato seguendo il metodo Laemmli [Laemmli, 1970]. La piastra elettroforetica è costituita da due tipi di gel:

- gel superiore o impaccatore (Stacking gel) a pH 6.8, che serve a concentrare le proteine del campione e ne consente la partenza da uno stesso fronte;
- gel inferiore o di separazione (Running gel) a pH 8.8, nel quale avviene la separazione delle proteine.

Questa piastra, delle dimensioni di 8x10 cm, viene fissata nell'apposito apparecchio (Mighty small-se 250 hoefer scientific instruments). All'interno dell'apparecchio si aggiunge un tampone di corsa che consente il trasferimento di corrente tra i due elettrodi e quindi la corretta corsa e separazione delle proteine. Il

tampone di corsa è costituito da Tris 50 mM, glicina 0.38 M, SDS 3.4 mM, EDTA 5 mM. La durata della corsa elettroforetica è di circa 1 ora e 30 minuti, a 40 mA/gel.

## **2.8 Western blotting e rivelazione anticorpale**

Il western blotting o immunoblotting è un saggio immunologico in grado di rivelare tracce di una specifica proteina in una miscela eterogenea, combinando l'elevato potere risolutivo dell'elettroforesi su gel con la specificità degli anticorpi. Il western blotting è una metodica ad elevata sensibilità, che rivela quantità di proteina dell'ordine dei nanogrammi.

I campioni ottenuti nelle differenti condizioni sperimentali sono sottoposti a corsa elettroforetica al 10% in SDS/PAGE e quindi trasferiti su membrane di nitrocellulosa per l'azione di un campo elettrico, ottenuto applicando all'apposito apparecchio una corrente di 350 mA per 2 ore e 30 minuti. Il tampone utilizzato per l'elettrotrasferimento è costituito da Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 20%, SDS 0.1% con pH finale 8.0. Al termine del blotting la membrana viene lasciata saturare per 1 ora; la saturazione ha la funzione di bloccare i siti aspecifici di interazione idrofobica, presenti nella nitrocellulosa. Questa incubazione viene effettuata nel seguente tampone A: Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, BSA 3%. Segue poi un'incubazione per tutta la notte a 4°C (o per 2 ore e 30 minuti a temperatura ambiente), con un opportuno anticorpo, diluito in un tampone composto di: Tris/HCl 50 mM, pH 7.5 NaCl 150 mM, BSA1%, NaN<sub>3</sub> 0.02% (tampone B). Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, si eseguono tre lavaggi di 10 minuti ciascuno, utilizzando il tampone B addizionato di Tween 0.1%. La membrana viene successivamente incubata per 30 minuti con un anticorpo secondario anti-IgG, opportunamente diluito in tampone B, ottenuto contro la specie animale immunizzata per avere il primo anticorpo. Dopo 3 ulteriori lavaggi, si esegue la rivelazione anticorpale con il sistema ECL ("Enhanced ChemiLuminescence"). I reagenti, a contatto con la membrana, in corrispondenza del complesso antigene-anticorpo danno origine ad una reazione di chemioluminescenza. Sopra la membrana è posta, per pochi minuti, una lastra autoradiografica, che viene impressionata dall'emissione di luce. La membrana,

quando richiesto, è stata ritrattata con gli anticorpi primari dopo “stripping” con un tampone costituito da 0.1 M glicina (pH 2.5), 0.5 M NaCl, 0.1% Tween 20, 1%  $\beta$ -mercaptoetanolo e 0.1% NaN<sub>3</sub>.

## 2.9 Gel elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE)

L'elettroforesi bidimensionale, o elettroforesi 2D, è un'altra tecnica di elettroforesi impiegata per separare una miscela di proteine. In questo caso, però, la separazione avviene in 2 dimensioni: nella prima, le proteine sono separate per punto isoelettrico, che le distingue sulla base del loro pH; nella seconda dimensione, esse vengono separate per massa molecolare. Una quantità di citosol pari a 150  $\mu$ g di proteine, in precedenza incubata o meno con PP2 10  $\mu$ M per 30 minuti è stata sottoposta a precipitazione in acetone a -20°C per 1 ora. Dopo una centrifugazione a 15.000g per 10 minuti, le proteine precipitate sono state solubilizzate in 125  $\mu$ l di tampone di isoelettrofocalizzazione, la cui composizione è la seguente: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 65 mM, anfoliti 0.5% (v/v) (Bio-Lyte 3-10 buffer) (Biorad). Il campione, dopo essere stato lasciato 1 ora a temperatura ambiente viene centrifugato a 15.000g per 10 minuti a 20°C, ed il sopranatante caricato su una *strip* di 7 cm a gradiente di pH immobilizzato (pH 3-10, oppure pH 4-7) (Biorad). Lasciata la *strip* 1 ora a temperatura ambiente per un iniziale assorbimento passivo del campione, si procede con una reidratazione attiva di 12 ore, applicando un potenziale di 50 V ed arrivando ad un voltaggio di 4000 V/*strip*. Successivamente, l'isoelettrofocalizzazione viene condotta a 20°C a 20.000Vh su Protean IEF Cell (Biorad). Le *strip* sono incubate per 15 minuti, a temperatura ambiente, nel seguente tampone di equilibratura a pH 8.8: Tris/HCl 0,375 mM, pH 8.8, urea 6 M, glicerolo 2% (v/v), SDS 2% (v/v) con aggiunta di ditiotreitolo (DTT) 2% (p/v). In seguito, i tioli ridotti sono alchilati lasciando la *strip* per 15 minuti nel tampone di equilibratura cui viene aggiunta di iodoacetammide (IAA) 2.5% (p/v). Le *strip* vengono poi ruotate di 90° e caricate su gel di poliacrilammide al 10% e sottoposte a SDS/PAGE, utilizzando l'apparato Mini Protean 3 Cell (Biorad). L'elettroforesi viene effettuata fornendo una corrente di 20 mA/gel.

## 2.10 Analisi bioinformatica

I potenziali substrati di Lyn sono stati identificati applicando il tool bioinformatico TagIdent accessibile attraverso il server ExPASy (<http://web.expasy.org/tagident/>), applicazione che ci ha permesso di creare una lista di proteine compatibili con le caratteristiche presenti nei quadri 2D rivelati mediante analisi Wb con l'anticorpo anti-pTyr. In particolare sono stati considerati un intervallo di pI compreso tra 4.5 e 5.5 e un peso molecolare tra 26 e 124 kDa (<http://web.expasy.org/tagident/>). La nostra ricerca ha evidenziato un elenco di 4331 proteine, le quali sono state ulteriormente selezionate aggiungendo ai criteri di ricerca entrambe le parole chiave 'citoplasma' o 'apoptosi'. Sono stati recuperati due sottogruppi di proteine, rispettivamente composti di 1528 e 183 proteine, l'intersezione di questi sottogruppi ha portato a isolare 103 proteine (Figura 15, capitolo Risultati). Queste sono state ulteriormente processate usando Phosphosite Plus® (<http://www.phosphosite.org>) [Hornbeck et al., 2012], un'applicazione interattiva disponibile per lo studio delle modificazioni post-traduzionali sperimentalmente osservate, quali la fosforilazione tirosinica.

Il risultato di tale analisi ha messo in evidenza 59 entries, le cui isoforme sono state escluse dal software, per le proteine corrispondenti abbiamo quindi considerato quelle per cui la fosforilazione tirosinica comporta una modifica della funzione, alla fine l'analisi ha generato un gruppo di 8 proteine.

## 2.11 Centrifugazione su gradiente di densità di glicerolo

150 µg di proteine citosoliche ottenute da cellule B normali e da cellule LLC-B sono state caricate su di un gradiente di glicerolo lineare (10-40%) costituito in 25 mM HEPES, pH 7.4, 1mM EDTA. I tubi sono stati centrifugati per 18 ore a 100000g in un rotore SW60Ti (Beckman) a 4°C e successivamente suddivisi in 18 frazioni da 200 µl raccolte dall'alto del gradiente. Dalle singole frazioni, sono state prelevate aliquote di 50 µl per analisi Wb e rivelazione con anticorpi specifici. Per determinare il peso molecolare dei complessi proteici rilevati, sono stati utilizzati i seguenti marcatori in gradienti di riferimento: glutammato deidrogenasi (62 kDa), alcool deidrogenasi (150 kDa), apoferritina (443 kDa) e tireoglobulina (669 kDa).

## **2.12 Immunoprecipitazione**

Le immunoprecipitazioni con proteina A-Sefarosio oppure proteina G PLUS sono state effettuate a partire da citosol, come tale o trattato, frazionato da  $3 \times 10^6$  cellule LLC-B. Prima di essere sottoposto a immunoprecipitazione, il campione è stato diluito con Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) in rapporto 1:1. Il citosol è stato incubato con gli anticorpi specifici e lasciato in agitazione tutta la notte a 4°C per permettere la formazione degli immunocomplessi. Si aggiunge proteina A-Sefarosio/proteina G PLUS, incubando a 4°C per 1 ora in modo da permettere l'associazione tra gli immunocomplessi e la proteina A/G. Si centrifuga poi a 4000g per 5 minuti a 4°C e si preleva il surnatante. Il precipitato, che contiene gli immunocomplessi legati alla resina, viene lavato tre volte con Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), con aggiunta di inibitori di fosfatasi, inibitori di proteasi, centrifugando ogni volta a 4000g per 5 minuti. Eliminato il supernatante, vengono aggiunti Laemmli buffer non riducente (Tris/HCl 0,625 M pH 6,8; SDS 2%; glicerolo 50%; pironina in tracce) ed SDS 20% (p/v). I campioni sono prima centrifugati e poi incubati a 100°C per 5 minuti per favorire il distacco della proteina A-Sefarosio/G PLUS dall'immunoprecipitato. Infine si carica la fase liquida su SDS/PAGE al 10%, per poi procedere con Western blotting e rivelazione con gli appropriati anticorpi.

## **2.13 Valutazione dell'apoptosi mediante citofluorimetria**

L'apoptosi dei campioni LLC-B sottoposti a diversi trattamenti descritti nella sezione Risultati, è stata valutata usando il kit "Annexin V Apoptosis Detection Kit".

Durante le prime fasi di apoptosi, la membrana plasmatica subisce notevoli cambiamenti che consentono il riconoscimento e l'eliminazione delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi. In questa fase precoce, la fosfatidilserina (PS), un ammino-fosfolipide a carica negativa normalmente espresso solo sul lato interno della membrana plasmatica, viene esposta sulla superficie esterna. Ad alte concentrazioni di  $Ca^{2+}$ , la proteina Annessina V riconosce e lega selettivamente

PS, rendendola utile per l'identificazione delle cellule apoptotiche che espongono il fosfolipide in superficie.

Dopo i diversi trattamenti *in vitro*, sono state raccolte aliquote di  $500 \times 10^3$  cellule LLC-B, lavate e incubate per 10 minuti al buio e a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l di *binding buffer*, una soluzione ricca di  $\text{Ca}^{2+}$  che ottimizza il legame dell'annessina PS, 5  $\mu$ l di Annessina V-FITC, e 10  $\mu$ l di Ioduro di Propidio (PI), fornito dal kit (concentrazione finale: 1  $\mu$ l/ml). Dopo l'incubazione, sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di *binding buffer* e le cellule sono state analizzate mediante il citofluorimetro a flusso FACScan. Per ogni campione sono stati acquisiti 20.000 eventi e il numero di cellule apoptotiche è stato espresso come percentuale di cellule positive ad Annessina V sulle cellule totali analizzate mediante il software FacsDiva.

Per differenziare le percentuali di apoptosi sono stati usati i seguenti anticorpi: Annexin V-FITC, anti-CD5 PE-Cy5 e anti-CD19 APC. Il numero di cellule apoptotiche è stato espresso come percentuale di cellule CD19+/CD5+/Annexin V+ sul totale delle cellule analizzate.

## **2.14 Analisi statistica**

I dati della seguente tesi sono stati espressi come media  $\pm$  DS della media dei valori e confrontati usando l'analisi della varianza a una via seguita dal *post hoc* test di Bonferroni oppure il test t-Student. I valori con  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata effettuata usando il software GraphPad (versione 5) (GraphPad Software; San Diego, CA, USA).

## **3 - METODICHE IMPIEGATE IN RISULTATI PARTE PRIMA**

### **3.1 Trattamento con fosfatasi- $\lambda$**

Il saggio di defosforilazione con fosfatasi- $\lambda$  viene effettuato sulla frazione citosolica, ottenuta da  $3 \times 10^6$  cellule leucemiche, usando un tampone isotonico, senza aggiunta di sodio ortovanadato. Al campione vengono aggiunti  $\text{MnCl}_2$  20mM e fosfatasi- $\lambda$  buffer, secondo le indicazioni della casa produttrice (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e 300 unità di fosfatasi- $\lambda$ . Dopo 45 minuti di incubazione, l'attività fosfataseica è stata bloccata con l'aggiunta di inibitori fosfataseici e di sodio ortovanadato.

### **3.2 Saggio di attività di caspasi-8**

Il saggio di attività di caspasi-8 viene effettuato sulla frazione citosolica (ottenuta da  $3 \times 10^6$  cellule leucemiche), come tale o trattata con fosfatasi- $\lambda$ .

Al citosol viene aggiunto un uguale volume di buffer di reazione e la molecola IETD-pNA contenente la sequenza amminoacidica IETD legata al cromoforo p-nitroanilide (pNA), secondo le indicazioni della casa produttrice (Alexis Corporation, Lausen, CH).

Il campione viene incubato per 2 ore a  $37^\circ\text{C}$  e successivamente viene effettuata una lettura dell'assorbanza a 400 nm.

Il saggio è basato sulla rilevazione allo spettrofotometro del cromoforo pNA, dopo taglio della molecola substrato da parte della caspasi-8. L'attività di caspasi-8 viene determinata mediante confronto con un controllo nel quale non è stato aggiunto il substrato IETD-pNA.

### **3.3 Purificazione di caspasi 8 da cellule LLC-B**

Caspasi 8 è stata purificata dalle proteine citosoliche in assenza d'inibitori fosfataseici mediante tre passaggi sequenziali di cromatografia. In sintesi, 0.5 g di citosol sono stati caricati su una colonna DEAE Fast Flow, equilibrata in Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), glicerolo 100%, NaCl 5mM,  $\beta$ -mercaptoetanolo 10 mM,

cocktail di inibitori di fosfatasi 2 e 3 (Tampone di equilibratura, TE), l'eluizione è stata condotta con un gradiente di NaCl (0.05 - 0.5 M). Le frazioni risultate positive all'anticorpo anti-procasp8 sono state riunite e caricate su Poli-L-lisina-Agarosio equilibrata con TE. Le frazioni positive per l'anticorpo anti-procaspasi 8 in seguito alle eluizioni nelle stesse condizioni descritte sopra sono state riunite e applicate ad una colonna FPLC-Superdex S200 (30 × 1.5 cm) equilibrata con TE a cui è stato poi aggiunto NaCl 0.5 M. Le frazioni eluite sono state analizzate con gli anticorpi anti-p-procasp8 e anti-procasp8 e poi riunite per gli esperimenti successivi.

### **3.4 Saggio di fosforilazione di caspasi 8**

Per determinare l'incorporazione di fosfato di procasp-8 (0.4 μM), abbiamo eseguito un saggio di fosforilazione nel tempo (20 minuti), in un tampone costituito di Tris/HCl 50 mM, pH 7.5, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, [ $\gamma^{32}$ -P]ATP 200 μM e 2 nM Lyn nativa purificata da milza di ratto [Donella-Deana et al., 1996], a 30°C (volume finale 30 μl), fermato mediante l'aggiunta di un tampone contenente SDS al 2%. Procasp8 è stata poi risolta mediante SDS-PAGE (gel al 15%) e l'incorporazione del fosfato è stato quantificata analizzando l'emissione delle bande radioattive determinata in un contatore di emissioni β (Cyclone Packard, Meriden, CT). Per valutare l'effetto della fosforilazione sullo stato di aggregazione e sull'attività proteolitica, è stata fosforilata una quantità maggiore di procaspasi 8 (8 μg per ogni saggio) in 500 μl di tampone di fosforilazione in presenza di Lyn 50 nM.

### **3.5 Silenziamento genico**

La trasfezione siRNA nelle cellule LLC-B isolate dai pazienti esaminati, è stata eseguita usando il sistema "AMAXA Nucleofection system" (AMAXA, Colonia, Germania) come riportato in Ticchioni et al [Ticchioni et al., 2007]. Brevemente, 5×10<sup>6</sup> cellule sono state risospese in 100 μl di Nucleofector Solution, miscelate con 300 nM di siRNA duplex (controllo, contro procaspasi 8 o contro Bid), e sottoposte a elettroporazione usando il programma U-015 sul sistema di

nucleofezione AMAXA. Le cellule sono state poi trasferite in terreno completo e incubate per 48 ore a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## **4 - METODICHE IMPIEGATE IN RISULTATI PARTE SECONDA**

### **4.1 Saggio di attività di PP2A**

Il saggio di attività di PP2A è stato eseguito incubando aliquote di lisati totali LLC-B sottoposti a vari trattamenti, in un tampone costituito di 20 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA e 1 mM DTT, pH 7.5 e usando pAkt immunoprecipitata dalle cellule LLC-B come substrato. pAkt è stata poi analizzata mediante analisi Wb con anticorpo anti-pAkt e le membrane sono state poi incubate con anticorpo anti-Akt come controllo di carico. In alternativa, l'attività fosfataseica è stata misurata usando il "Malachite Green-based Phosphatase Assay Kit 1 (K-R-pT-I-R-R)" (Merck Millipore).

### **4.2 Sintesi degli analoghi di fingolimod**

Gli analoghi di Fingolimod sono stati forniti dal laboratorio di Sintesi Organica del prof. G. Zagotto del Dip.to di Scienze del Farmaco (Università di Padova). Tutti i composti impiegati sono stati preparati a partire da p-idrossibenzaldeide, tramite eterificazione di Williamson [Gamliel et al., 2008], e amminazione riduttiva [Masuzawa et al., 2008] e in seguito caratterizzati mediante spettroscopia HRMS (Mariner Applied Biosystems ESI-TOF spectrometer) e NMR (NMR Bruker AVANCE III 400).

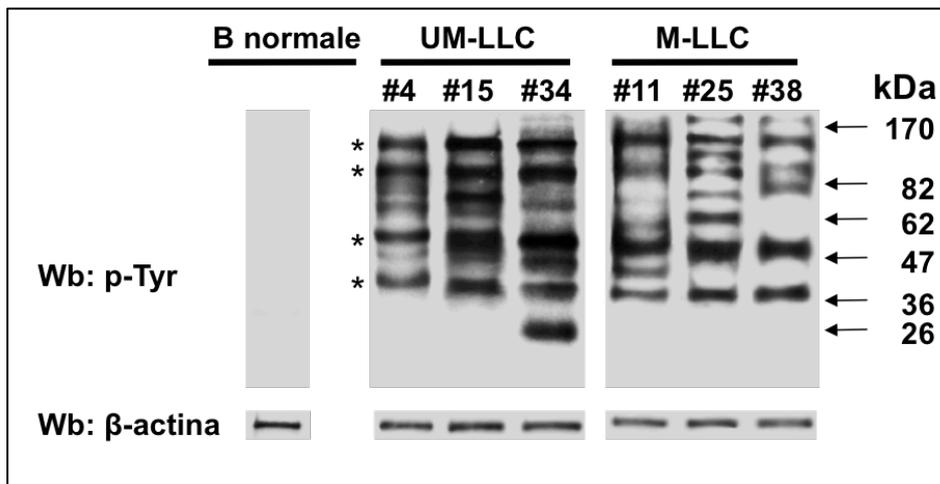
## RISULTATI E DISCUSSIONE

### 1 - Fosforilazione tirosinica del proteoma citosolico nelle cellule LLC-B

Nel nostro laboratorio è stato in precedenza dimostrato che i pazienti LLC-B presentano un alto livello di fosforilazione tirosinica nella frazione citosolica delle cellule leucemiche a causa dell'atipica localizzazione e attivazione costitutiva della chinasi Lyn [Trentin et al., 2008; Tibaldi et al., 2011].

Questa osservazione ci ha portato ad analizzare lo stato di fosforilazione tirosinica citosolica in pazienti con diverso stadio clinico, UM-LLC e M-LLC, allo scopo di identificare i marcatori biologici implicati nel processo di sopravvivenza del clone leucemico.

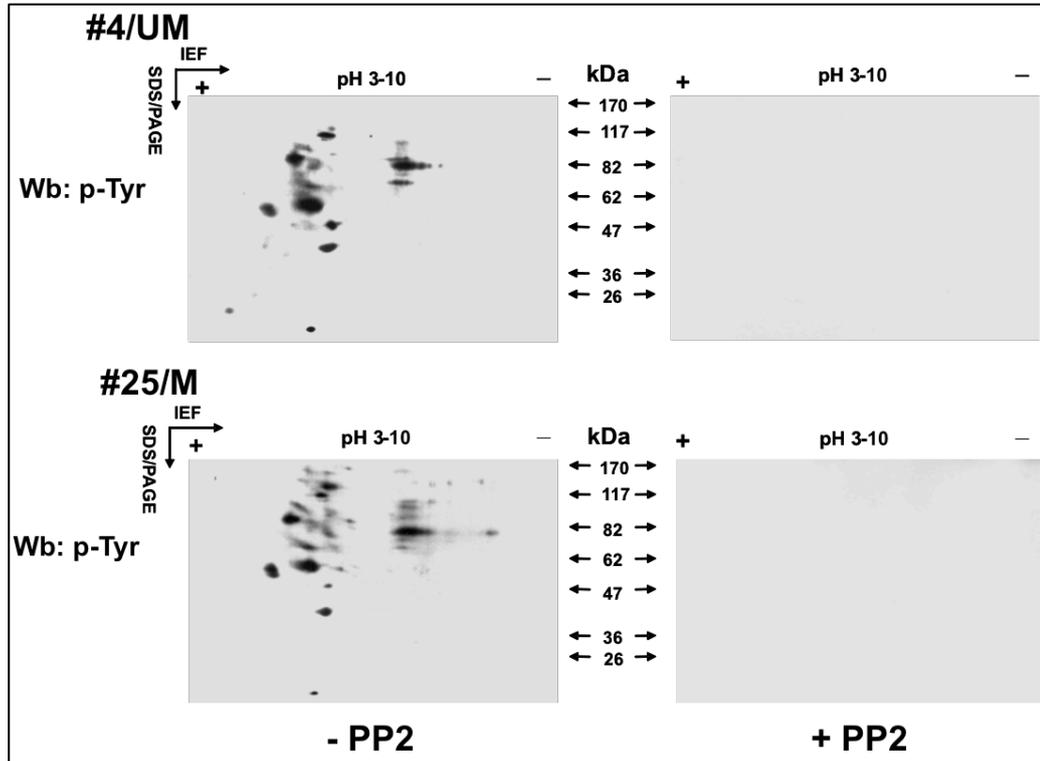
Indipendentemente dallo stato mutazionale dei geni IGVH, i profili fosfortirosinici hanno mostrato una grande variabilità, eccetto che per la presenza di alcune bande comuni con un peso molecolare apparente di circa 110, 90, 55 e 40 kDa (Fig.13).



**Figura 13.** Variabilità dello stato di fosforilazione tirosinica nel citosol di cellule B normali e di pazienti LLC-B. Il citosol di cellule B appena isolate da donatori sani e da pazienti LLC-B distribuiti tra i sottogruppi UM-LLC (pazienti 5, 15, 34) e M-LLC (pazienti 11, 25, 38) è stato analizzato mediante analisi Wb con anticorpi anti-p-Tyr e anti- $\beta$ -actina come controllo di carico. Gli asterischi indicano le bande ricorrenti riscontrate nei campioni LLC-B esaminati.

Il citosol ottenuto dalle cellule leucemiche di 24 pazienti LLC-B è stato sottoposto ad incubazione in presenza o in assenza dell'inibitore SFK PP2 (10  $\mu$ M) e sottoposto a 2D-PAGE usando un gradiente di pH immobilizzato 3-10. L'analisi

di Western blotting con anticorpo anti-pTyr ha rivelato la presenza di spot proteici con pI variabile tra 4.5 e 5.5 comuni a tutti i campioni testati. Inoltre, la maggior parte delle proteine rivelate nel citosol di controllo sono risultate assenti nel citosol trattato con l'inibitore SFK (Fig.14: pannello sinistro vs pannello destro) a conferma del fatto che la fosforilazione tirosinica è dovuta a Lyn.

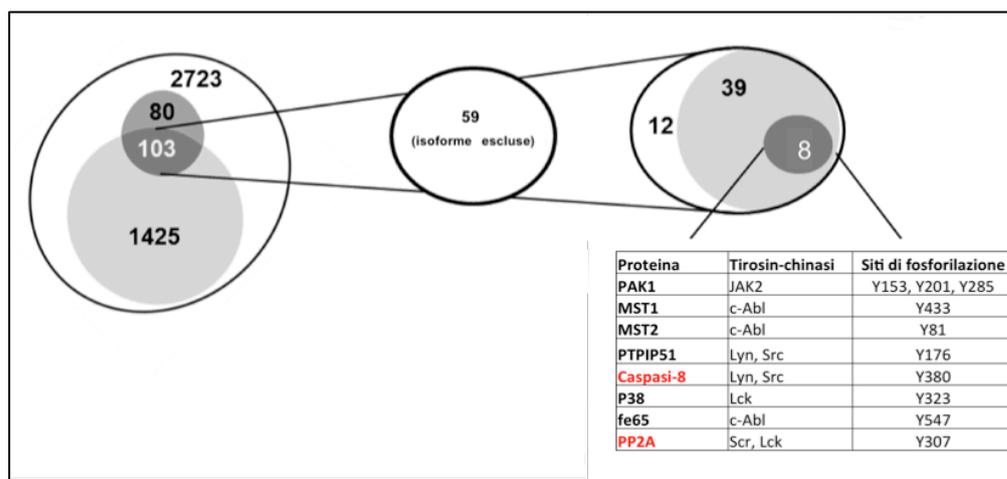


**Figura 14.** Nelle cellule LLC-B l'attività aberrante di Lyn è responsabile della differente fosforilazione tirosinica del subproteoma citosolico. Il citosol di cellule LLC-B appena isolate, purificato da pazienti in diverso stadio clinico, appartenenti ai sottogruppi IgVH non mutati (UM-LLC) e mutati (M-LLC) (pazienti 4 e 25, nella figura) è stato trattato (pannelli di sinistra) o meno (pannelli di destra) con PP2 10 mM, è stato poi separato mediante 2D-PAGE in un gradiente di pH lineare ad ampio range (pH 3-10) ed in seguito sottoposto ad analisi Wb con anticorpo anti-p-Tyr. La figura è rappresentativa dei campioni da 6 donatori sani e 24 pazienti LLC-B appartenenti ai sottogruppi UM-LLC e M-LLC, ognuno dei quali comprensivo di 12 campioni.

## 2 - Ricerca dei potenziali substrati citosolici di Lyn mediante analisi di 2D-PAGE e approccio bioinformatico

Allo scopo di identificare i possibili substrati di Lyn potenzialmente coinvolti con la mancata apoptosi cellulare, abbiamo identificato gli spot fosforilati comuni a tutti i campioni e abbiamo valutato la loro distribuzione rispetto al punto isoelettrico e al peso molecolare. Abbiamo quindi adottato un approccio di natura

bioinformatica, come descritto nella sezione “Metodiche impiegate in Risultati Parte Prima”, applicando, come criteri selettivi, le caratteristiche del fosfoproteoma 2D (pI, peso molecolare e localizzazione subcellulare). La nostra ricerca ha evidenziato 8 proteine comuni, tra queste sono state riscontrate la cistein-proteasi caspasi 8 e la proteina oncosoppressore PP2A (Fig.15).

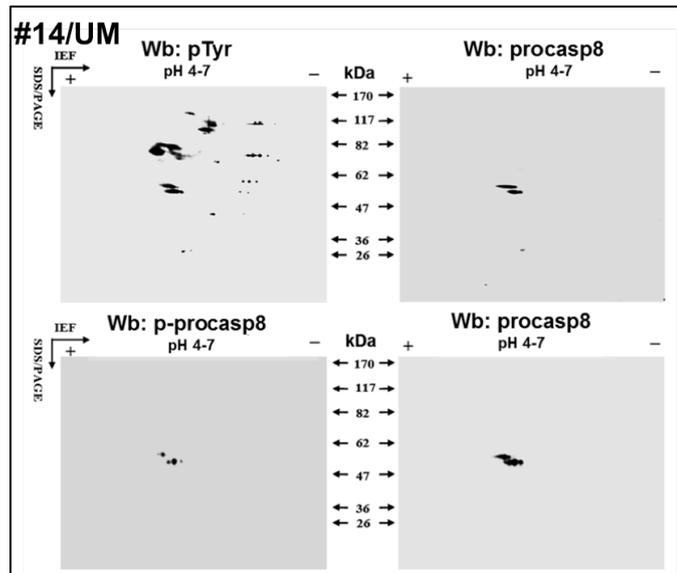


**Figura 15.** Gruppo di proteine note per essere regolate dalla fosforilazione tirosinica, identificate mediante analisi bioinformatica. I diagrammi di Venn rappresentano le 4331 proteine, con pI 4.5-5.5 e peso molecolare 75000 ± 49000 kDa, recuperate mediante il tool bioinformatico Tagident. Applicando come criteri selettivi le parole chiave citoplasma e apoptosi, sono stati isolati due sottogruppi composti da 1528 e 183 proteine, rispettivamente. L'intersezione dei due gruppi ha isolato 103 elementi (gruppo di sinistra) che sono stati poi processati con l'applicazione Phosphosite Plus. Escludendo le possibili isoforme proteiche, sono state rinvenute 59 proteine, tra queste, solo 47 sono bersaglio di fosforilazione tirosinica (gruppo di destra). La tabella riportata in figura elenca le 8 proteine isolate, per cui la letteratura riporta una correlazione diretta tra lo stato fosforilato e la funzione.

## PARTE PRIMA

In primo luogo, abbiamo rivolto la nostra attenzione alla caspasi 8, essendo questa una molecola implicata nelle fasi iniziali del processo apoptotico. In letteratura, la fosforilazione di tale proteasi è descritta come un meccanismo di soppressione dell'apoptosi in cellule tumorali, nelle quali spesso l'attività tirosin-chinasica delle Src è up-regolata. In particolare, le chinasi SFK fosforilano la forma non attiva della proteasi, lo zimogeno procaspasi 8, a livello del residuo tirosinico 380 determinando l'inibizione dell'attività proteolitica caratteristica della proteasi [Cursi et al., 2006; Jia et al., 2008].

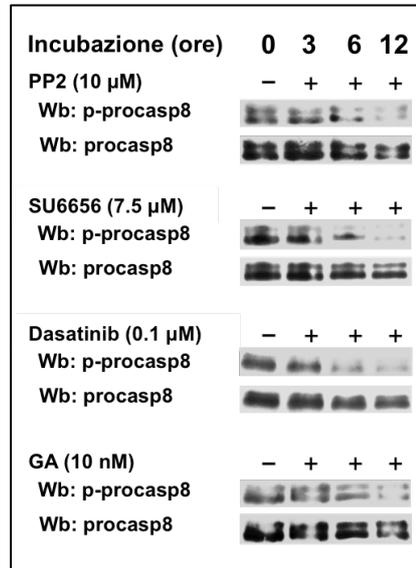
Al fine di valutare l'ipotesi che, nella patologia in esame, la procaspasi 8 venga fosforilata da Lyn, i campioni di citosol di 12 pazienti, 6 UM-LLC e 6 M-LLC, sono stati sottoposti a 2D-PAGE utilizzando un range di pH (pH 4-7) che permette di discriminare meglio proteine con punto isoelettrico acido. Dall'analisi del quadro fosfotirosinico riportato nella Figura 16, è stata riscontrata la presenza di un doppietto immunoreattivo all'anticorpo anti-procaspasi 8 (pannelli di destra), il quale si è dimostrato compatibile con le bande rivelate con gli anticorpi anti-pTyr (pannello in alto a sinistra) e anti-p-procaspasi 8 (anti-pTyr380) (pannello in basso a sinistra). Questi dati indicano che procaspasi 8 è una componente del proteoma fosfotirosinico e viene fosforilata in Tyr380, residuo bersaglio dell'attività delle SFKs.



**Figura 16. Elettroforesi bidimensionale della frazione citosolica di cellule B-LLC.** Il citosol purificato da cellule B isolate da 12 pazienti LLC-B equamente distribuiti tra i sottogruppi non mutati e mutati, è stato separato mediante 2D-PAGE usando un gradiente lineare di pH immobilizzato (pH 4-7, narrow range) per la prima dimensione per successive analisi Wb con anticorpi anti-p-Tyr e anti-p-procasp8. Gli immunoblot sono stati poi sottoposti a stripping e incubati nuovamente con anticorpo anti-procasp8. La figura mostra i quadri Wb del paziente 14 ed è rappresentativa di tutti i campioni trattati.

In secondo luogo, per verificare se la sottopopolazione di Lyn associata al complesso citosolico aberrante è responsabile della fosforilazione di procasp8, le cellule leucemiche sono state trattate con geldanamicina (GA), inibitore di HSP90, per causare la rottura del complesso aberrante con conseguente

inattivazione della frazione citosolica di Lyn [Trentin et al., 2008]. Come dimostrato in Figura 17, il trattamento con PP2 o GA a tempi diversi ha portato alla defosforilazione della procaspasi 8, indicando tale molecola come substrato dell'anomala attività di Lyn nelle cellule LLC-B.

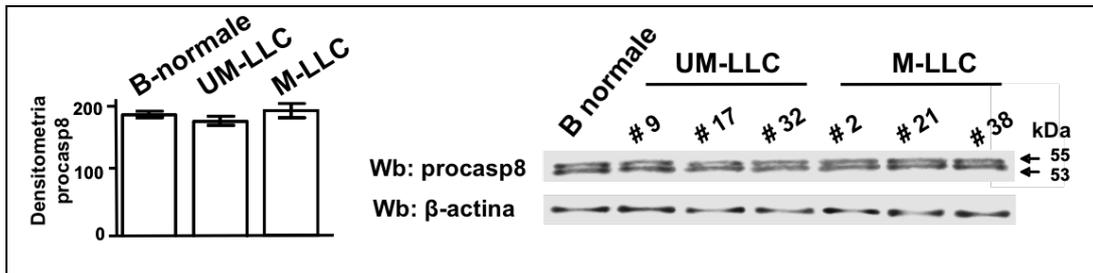


**Figura 17.** Nelle cellule LLC-B procaspasi 8 costituisce un substrato dell'anomala attività di Lyn. I lisati totali di cellule B di LLC appena isolate coltivate un'assenza o presenza di 10 mM PP2, 7.5 mM SU6656, 0.1 mM dasatinib o 10 nM GA a tempi differenti, sono state sottoposte ad analisi Wb con gli anticorpi anti-p-procasp8 e anti-procasp8. Le figure sono rappresentative dei campioni provenienti da 10 pazienti LLC-B appartenenti a due differenti sottogruppi UM e M-LLC composti da 5 campioni ciascuno.

## 1 - Procaspasi 8 è ugualmente espressa e inibita nelle cellule UM-LLC e M-LLC

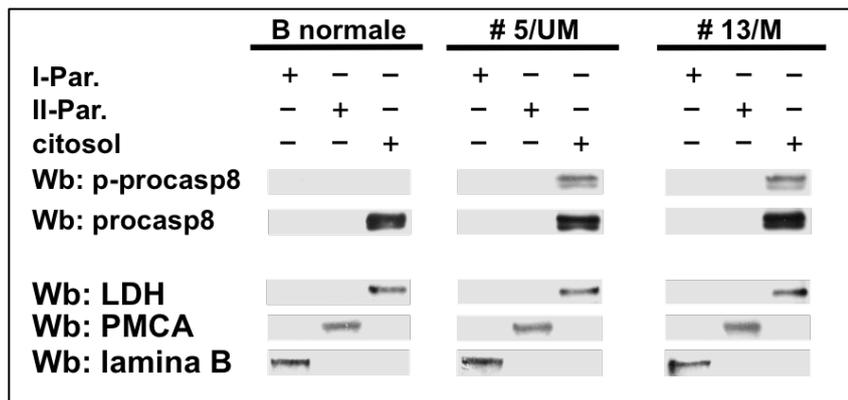
La caspasi 8 è una cisteina-proteasi che agisce come molecola iniziatrice nella via estrinseca della cascata apoptotica. Questo processo inizia in seguito al reclutamento della forma inattiva della caspasi 8 (procaspasi 8) sul complesso DISC (Death-Inducing Signaling Complex) in risposta al legame dei recettori di morte, con conseguente dimerizzazione, taglio proteolitico e completa attivazione della molecola [Frish, 2008; Fulda, 2009; Kantari et al., 2011]. Inoltre, la recente letteratura attribuisce a tale proteina un ruolo regolatorio nell'ambito di alcuni processi cellulari di natura non apoptotica quali la proliferazione, l'adesione, il differenziamento e la migrazione cellulare [Maelfait et al., 2008; Zhao et al., 2010; Leverrier et al., 2011; Finlay et al., 2009]. Allo scopo di comprendere come

la fosforilazione mediata da Lyn sia in grado di modificare la funzione di procaspasi 8 nelle cellule LLC-B, è stata saggiata l'espressione proteica nelle cellule leucemiche di 40 pazienti reclutati e confrontata con linfociti B provenienti da donatori sani. I lisati cellulari sottoposti ad analisi di Western blotting con anticorpo anti-procaspasi 8 non hanno mostrato differenze di espressione proteica fra i diversi affetti e neppure fra i pazienti e i linfociti B di controllo (Figura 18), a riprova del fatto che nelle tumorali il livello di espressione della proteasi rimane per lo più inalterato [Finlay et al., 2009].



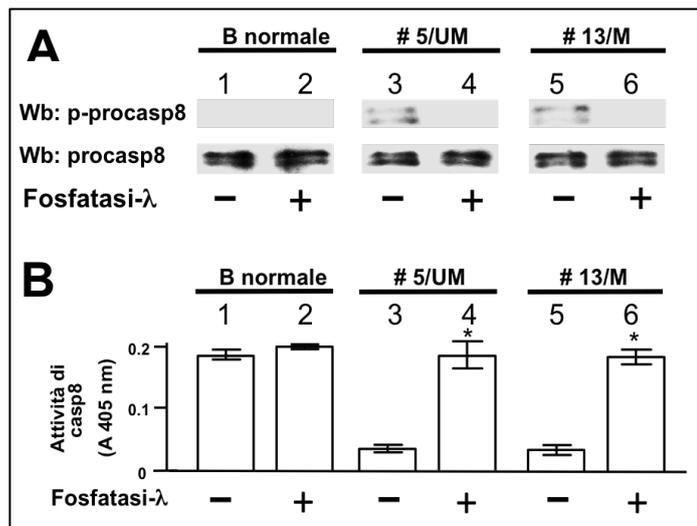
**Figura 18. Procaspasi 8 è ugualmente espressa nei linfociti B sani e LLC-B.** I lisati cellulari totali da 6 donatori sani e da tutti i pazienti LLC-B distribuiti tra i sottogruppi UM-LLC e M-LLC (Tabella I) sono stati analizzati mediante Wb con anticorpo anti-procaspasi 8, e gli stessi blot sono stati poi incubati con anticorpo anti- $\beta$ -actina come controllo di carico. La figura mostra l'analisi densitometrica (unità arbitrarie) delle bande Wb degli immunoblot (pannello a sinistra). Le analisi Wb rappresentative di un donatore sano e dei vari pazienti LLC-B ugualmente distribuiti tra i sottogruppi non mutati (pazienti 9, 17, 32) e mutati (pazienti 2, 21, 38) sono mostrate nel pannello a destra.

Mediante tecniche di centrifugazione differenziale, è stata dimostrata la localizzazione esclusivamente citosolica di procaspasi 8 sia per i linfociti B normali che per i patologici; indipendentemente dalla stadiazione e dallo stato mutazionale dei geni *IGVH* (Figura 19). Nonostante le cellule normali e leucemiche mostrino la stessa localizzazione e lo stesso profilo di espressione di procaspasi 8, le cellule LLC-B possiedono una caratteristica peculiare, la fosforilazione della proteasi in Tyr380, che è dovuta all'azione della forma citosolica di Lyn [Trentin et al., 2008]. Ciò indica una probabile inibizione dell'attività proteolitica di caspasi 8.



**Figura 19. Procaspasi 8 localizza nel citosol dei linfociti B sani e patologici, la fosforilazione in Tyr380 è peculiare delle cellule LLC-B.** Quantità equivalenti di proteina delle diverse frazioni subcellulari (prima frazione particolata, I-Par., corrispondente a nuclei e mitocondri; seconda frazione particolata, II-Par., corrispondente ai microsomi; e citosol) da donatori normali e pazienti LLC-B appartenenti ai sottogruppi non mutati e mutati (rappresentati dai pazienti 5 e 13, rispettivamente, a confronto con un donatore sano) sono state analizzate mediante analisi Wb con anticorpo anti-procasp8, e i blot sono stati poi incubati con anticorpi contro lattico deidrogenasi (LDH, marcatore citosolico), Ca<sup>2+</sup> ATPasi della membrana plasmatica (PMCA, marcatore di membrana plasmatica), e lamina (marcatore nucleare) come controllo di carico. La figura è rappresentativa di campioni da 3 donatori normali e 10 pazienti LLC appartenenti a 2 diversi sottogruppi non mutati e mutati composti da 5 campioni ciascuno.

Per saggiare lo stato funzionale della procaspasi 8, il citosol di linfociti B da 3 donatori sani e 20 pazienti leucemici è stato sottoposto ad immunoprecipitazione con anticorpo anti-pTyr380 e anti-procasp8 e testato per l'attività caspasi prima o dopo incubazione con fosfatasi-λ. La fosforilazione in Tyr380 si è rivelata cruciale per l'inibizione dell'attività proteasica sia nei pazienti UM-LLC sia nei M-LLC (Fig.20A-B: colonne 3, 5); questo non avviene invece nelle cellule B sane (Fig.20A-B: colonne 1, 2). Abbiamo quindi dimostrato la reversibilità di questo effetto negativo: il trattamento con fosfatasi-λ porta alla defosforilazione e alla successiva attivazione della procaspasi 8 (Fig.20A-B: colonne 4, 6), ciò comprova il ruolo assunto da Lyn nella regolazione negativa della proteasi.

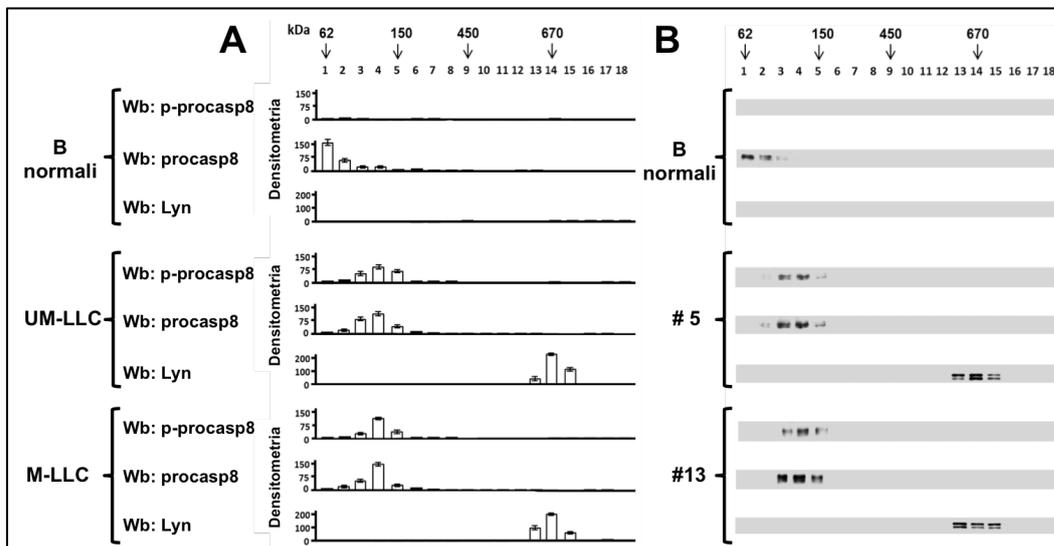


**Figura 20. La fosforilazione tirosinica dovuta a Lyn inibisce l'attività di caspasi 8 nelle cellule LLC-B.** (A) Il citosol dai donatori sani e dai pazienti LLC-B dei sottogruppi non mutati e mutati (pazienti 5 e 13, rispettivamente, a confronto con un donatore sano) è stato incubato in presenza (colonne 2, 4 e 6) o in assenza di fosfatasi-λ (colonne 1, 3, 5) per 1 ora a 37°C. Quantità uguali di proteina sono state sottoposte ad analisi Wb con anticorpi anti-p-procasp8 e anti-procasp8 (A) oppure saggiate in vitro per l'attività di caspasi 8 (B). La figura è rappresentativa dei campioni da 3 donatori sani e 20 pazienti LLC-B appartenenti ai sottogruppi non mutati e mutati composti da 10 campioni ciascuno (\*,  $p < 0.05$ , colonne 3,5 vs 4,6).

## 2 - La fosforilazione sul residuo Tyr380 è necessaria all'assemblaggio del dimero inattivo di procaspasi 8

Alla luce del fatto che l'attivazione della procaspasi 8 avviene mediante formazione di un dimero con riarrangiamenti strutturali del sito attivo [Donepudi et al, 2003; Boatright et al, 2003; Keller et al, 2010], abbiamo valutato se nelle cellule LLC-B, la fosforilazione mediata da Lyn potesse in qualche modo agire sulla dimerizzazione della proteasi. Il citosol di linfociti B normali e di 14 pazienti, 7 UM-LLC e 7 M-LLC, è stato frazionato su di un gradiente di glicerolo lineare e le frazioni risultanti sono state saggiate per mezzo di Western blotting per la presenza di procaspasi 8, fosfo-procaspasi 8 e Lyn. Come dimostra la Figura 21, nelle cellule B normali la procaspasi 8 è stata rilevata ad un peso molecolare compatibile con una forma monomerica e in uno stato non fosforilato (pannello in alto) mentre nelle cellule patologiche si è riscontrato un peso molecolare corrispondente ad una forma dimerica, fosforilata a livello di Tyr380 (pannelli medi in basso). Questo dato suggerisce una correlazione diretta tra

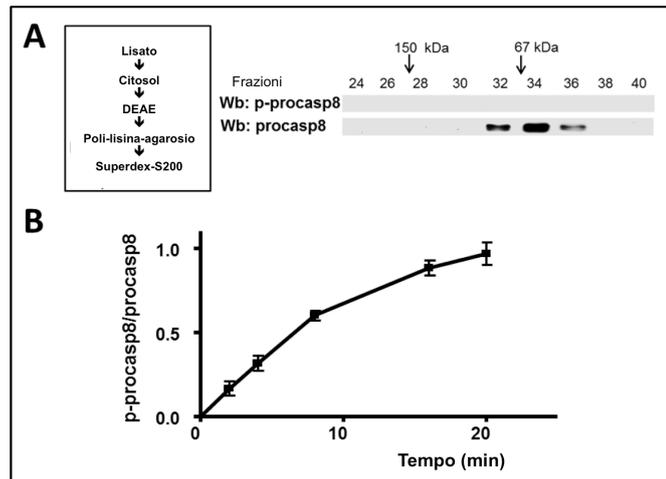
l'assemblaggio e lo stato di fosforilazione della procaspasi 8. A riprova della nostra ipotesi, gli esperimenti d'immunoprecipitazione ci hanno consentito di escludere il legame tra procaspasi 8 e molecole come la subunità p58 della PI3-K [Senft et al, 2007] e c-FLIP [Van Raam et al, 2012], che potrebbero associarsi durante la fase di assemblaggio della proteasi. Inoltre nonostante sia stato dimostrato che la SFK Src può legarsi al dominio DED della procaspasi 8 [Finlay et al, 2009] indipendentemente dallo stato fosforilato della proteasi, abbiamo ipotizzato che la procaspasi potesse non interagire con Lyn, il quale è parte integrante di un complesso citosolico aberrante di 600 kDa [Trentin et al., 2008].



**Figura 21. Procaspasi 8 è presente come un dimero nelle cellule LLC-B.** Il citosol di  $15 \times 10^6$  cellule isolate da due donatori normali e da 14 pazienti LLC-B equamente distribuiti tra i sottogruppi UM-LLC e M-LLC è stato sottoposto a gradiente di glicerolo lineare (10%-40%) ed è stato centrifugato per 18 ore a 100.000g in un rotore Sw60Ti (Beckman Coulter) a 4°C. (A) 18 frazioni (200  $\mu$ l ciascuna) del gradiente di glicerolo sono state raccolte dall'alto e sottoposte ad analisi Wb con anticorpi anti-p-procasp8, anti-procasp8, e anti-Lyn. La figura mostra le analisi densitometriche (unità arbitrarie) delle bande Wb degli immunoblot da 2 donatori sani e 14 pazienti LLC-B ugualmente distribuiti tra i sottogruppi UM-LLC e M-LLC. (B) Analisi dei Wb da un campione normale a confronto con quella dei sottogruppi UM-LLC (n° 5) e M-LLC (n° 13).

Per meglio definire il ruolo di Lyn nella formazione del dimero di procaspasi 8, è stata fosforilata *de novo* in presenza di Lyn dopo la purificazione dal citosol di 30 pazienti LLC eseguita in assenza di inibitori fosfatasi. La purificazione è stata condotta combinando tre processi sequenziali di cromatografia, lo scambio ionico, la cromatografia ad affinità e la gel filtrazione. Il profilo di eluizione riscontrato dopo gel filtrazione ha mostrato la procaspasi 8 ad un peso molecolare di circa 60

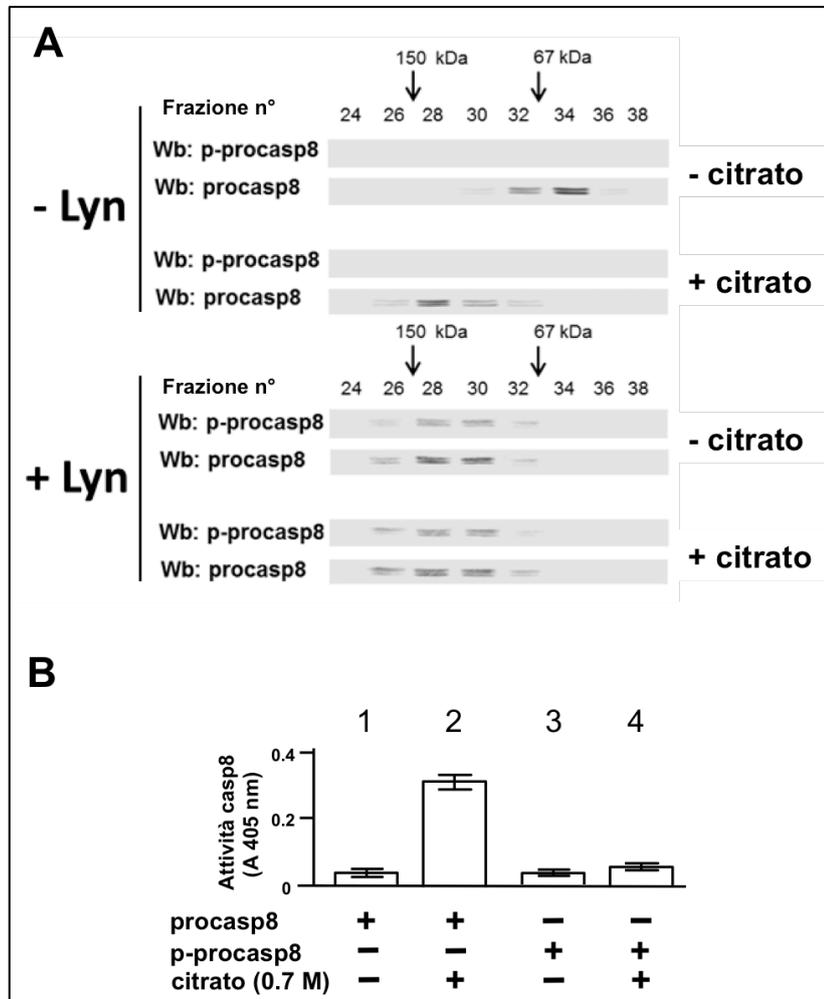
kDa compatibile con una forma monomerica, non fosforilata (Figura 22A). I saggi di fosforilazione condotti *in vitro* hanno dimostrato che la fosforilazione della procaspasi 8 avviene in rapporto stechiometrico di circa 1 mole di fosfato per mole di proteina, ciò a dimostrazione del fatto che la procaspasi 8 possiede un unico sito fosforilabile da Lyn, cioè la Tyr380 (Figura 22B).



**Figura 22. Fosforilazione di procaspasi 8 purificata dal citosol dei pazienti LLC-B in presenza di Lyn.** (A) Schema del processo di purificazione di procaspasi 8 dal citosol di pazienti LLC-B in diverso stadio clinico, in assenza di inibitori fosfatasi (pannello a sinistra). Il profilo di eluizione di procaspasi 8 da una colonna Superdex 200 HR ottenuto come descritto nella sezione Metodiche - Risultati Parte Prima è stato determinato mediante analisi Wb con gli anticorpi anti-p-procasp8 e anti-procasp8. Le frecce indicano la posizione degli standard di peso molecolare posti nella colonna Superdex 200 HR: alcol deidrogenasi (150 kDa), BSA (67 kDa) (pannello a destra). (B) Time course della fosforilazione di procasp8 0.5  $\mu$ M con Lyn. L'incorporazione di fosfato nella proteina è stata misurata dopo SDS/PAGE sui campioni, taglio delle bande e conta con liquido di scintillazione.

Per approfondire il meccanismo mediante il quale la fosforilazione e/o la dimerizzazione agiscono sull'attività proteolitica della procaspasi 8, la proteasi purificata mediante gel filtrazione come tale oppure sottoposta in precedenza a saggio di fosforilazione, è stata incubata in presenza di citrato di sodio, noto agente cosmotropo che promuove l'attivazione della procaspasi 8 [Boatright et al., 2003]. Il profilo di eluizione mostrato in Figura 23A verifica quanto atteso: il sale citrato di sodio provoca la dimerizzazione della forma non fosforilata di procaspasi 8 (pannelli superiori - e +citrato, -Lyn) e il ripristino della sua attività proteolitica (Fig.22B, colonne 1 e 2). Invece, il trattamento con il sale cosmotropo della forma fosforilata di procaspasi 8 induce la dimerizzazione (pannelli inferiori

- e +citrato, +Lyn) ma previene la sua attivazione (Fig.23B, colonna 4). Queste evidenze sperimentali indicano l'importanza della fosforilazione di Tyr380 per la regolazione della struttura e funzione della procaspasi 8.

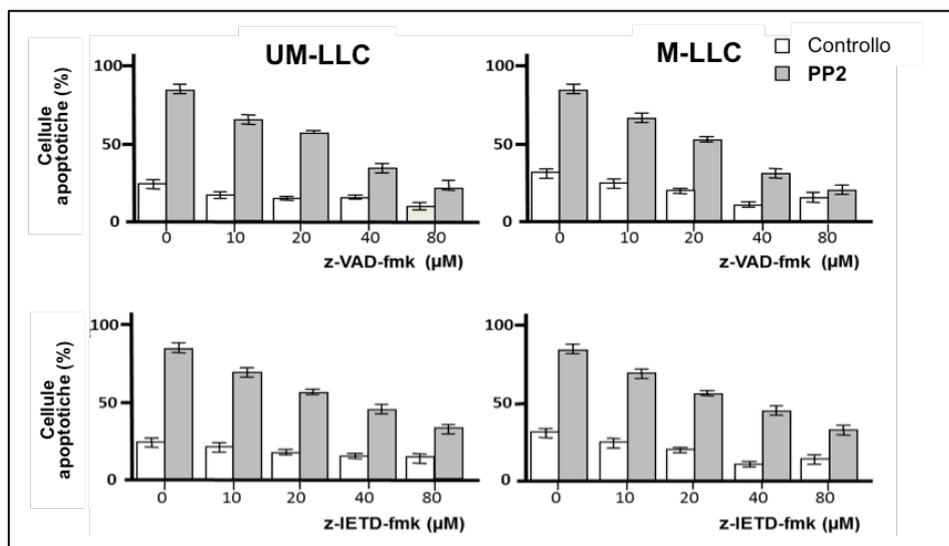


**Figura 23.** La fosforilazione di Tyr380 da parte di Lyn porta alla formazione di un dimero inattivo di procaspasi 8. (A) Procaspasi 8, come tale oppure fosforilata da Lyn e successivamente incubata in assenza o in presenza di sodio citrato 0.7 M è stata purificata mediante gel filtrazione su di una colonna Superdex 200 HR, il profilo di eluizione è stato determinato mediante analisi Wb con gli anticorpi anti-p-procasp8 e anti-procasp8. (B) Uguali quantità proteiche di procaspasi 8, come tale oppure fosforilata da parte di Lyn e in seguito incubata in presenza o in assenza di sodio citrato 0.7 M, sono state saggiate per l'attività caspatica in vitro come descritto nella sezione Metodiche impiegate in Risultati Parte Prima.

### 3 - L'inibizione di caspasi 8 dovuta alla fosforilazione da parte di Lyn previene l'apoptosi delle cellule LLC-B

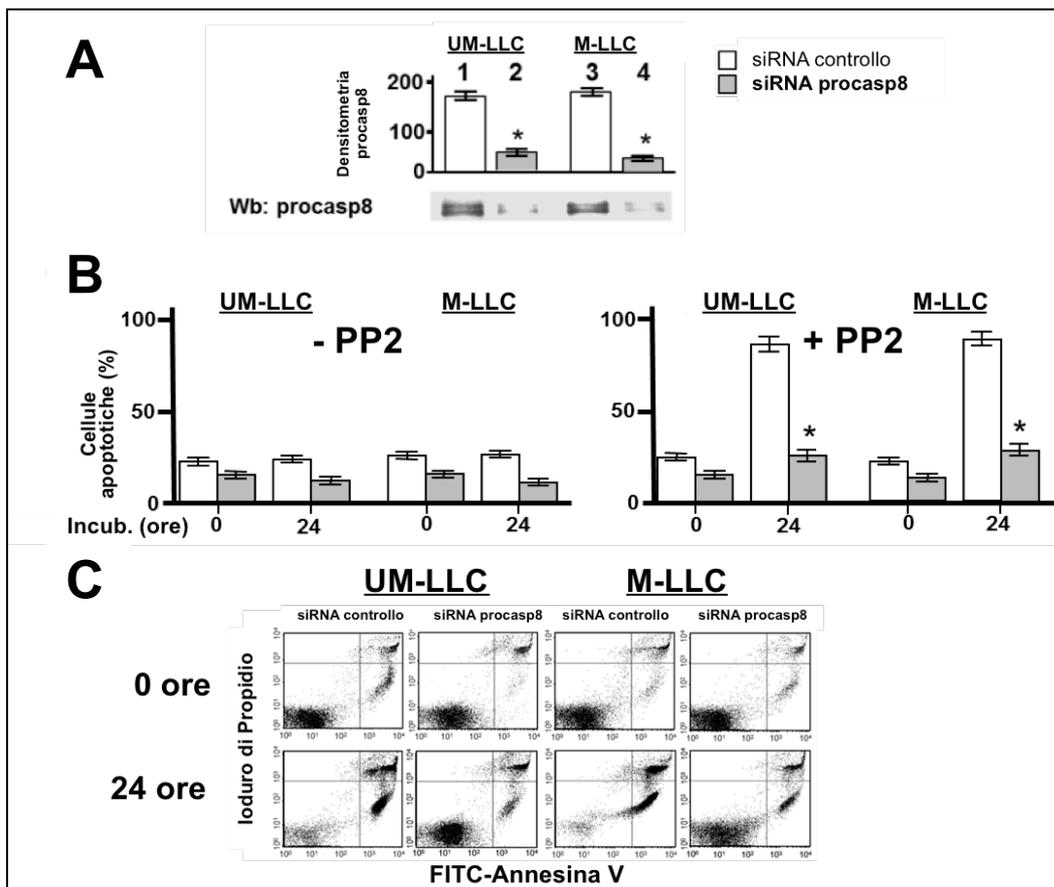
Poiché l'inibitore PP2 induce l'apoptosi delle cellule leucemiche attraverso la via caspatica [Contri et al., 2005], ci siamo chiesti se l'inibizione dell'attività proteolitica della procaspasi 8 potesse costituire un meccanismo mediante il quale Lyn esercita il suo potenziale anti-apoptotico nelle cellule LLC-B. Questo quesito riveste grande importanza in considerazione del fatto che la via apoptotica estrinseca a cui prende parte la caspasi 8 in condizioni fisiologiche, risulta difettiva nella patologia in esame a causa della bassa espressione e della refrattarietà dei recettori di morte posti sulla superficie dei cloni leucemici [Kamihira et al., 1997; MacFarlane et al., 2002].

Per valutare il contributo della caspasi 8 nel mediare il processo apoptotico indotto dagli inibitori SFK, abbiamo incubato le cellule di 16 pazienti LLC-B, 8 UM-LLC e 8 M-LLC, con concentrazioni crescenti di inibitore pan-caspasi z-VAD-fmk oppure con l'inibitore della procaspasi 8 z-IETD-fmk, in presenza o in assenza di 10  $\mu$ M PP2 per 24 ore. Come dimostrato nel pannello superiore della Figura 23, il trattamento con z-VAD-fmk a concentrazioni 40-80  $\mu$ M si è dimostrato protettivo nei confronti della morte cellulare indotta da PP2 in modo dose dipendente; un effetto simile è stato ottenuto usando l'inibitore specifico (Fig.23, pannello in basso).



**Figura 24. L'inibizione farmacologica e genetica di procasp8 riduce l'effetto apoptotico dell'inibizione di Lyn.** Le cellule LLC-B isolate sono state incubate in presenza o in assenza di 10 mM PP2 con concentrazioni crescenti di z-VAD-fmk (pannelli superiori) o z-IETD-fmk (pannelli inferiori) per 48 ore, e l'apoptosi cellulare è stata analizzata mediante citofluorimetria a flusso con kit annessina V-propidio ioduro (PI). L'analisi quadratica dei dati è stata espressa come percentuale media  $\pm$  DS dell'apoptosi precoce e tardiva da 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato sui campioni provenienti da 16 pazienti LLC-B appartenenti ai due sottogruppi diversi UM-LLC e M-LLC (rispettivamente pannelli di sinistra e di destra) composti da 8 campioni ciascuno. Rispetto all'effetto del solo PP2, le differenze si sono dimostrate significative alla concentrazione 10  $\mu$ M di z-VAD-fmk oppure di z-IETD-fmk.

Un ultimo approccio a conferma del ruolo della caspasi 8 nell'apoptosi indotta da PP2, è stato il silenziamento della proteasi con la metodica siRNA (Fig.25A), il quale ha condotto ad una riduzione dell'apoptosi paragonabile a quella ottenuta con l'uso di inibitori caspasi. Questa tecnica ha confermato che l'espressione di procasp8 è fondamentale per indurre l'apoptosi nelle cellule LLC-B trattate con PP2, ciò non accade quando sussiste la fosforilazione di procaspasi 8 da parte di Lyn (Fig. 25B-C).



**Figura 25. L'inibizione genetica di procasp8 riduce l'effetto apoptotico dell'inibizione di Lyn.** (A) Le cellule LLC-B isolate sono state trasfettate mediante nucleofezione sia con il controllo negativo (colonne 1 e 3) oppure con i siRNA procasp8 (colonne 2 e 4) ed incubate per 48 ore in terreno completo. I lisati cellulari sono stati poi sottoposti ad analisi Wb con gli anticorpi anti-

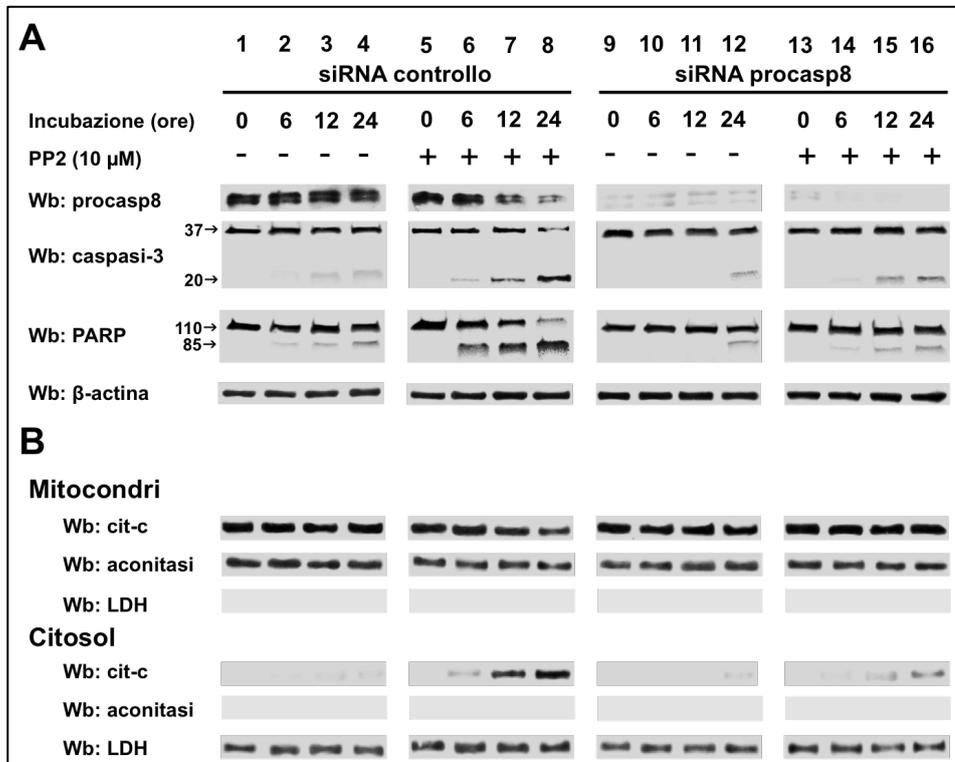
*procasp8 per verificare l'efficacia della metodica siRNA. L'espressione totale di procasp8 nelle cellule trattate con siRNA di procasp8 rispetto a quella delle cellule trasfettate con il controllo era significativamente diminuita (\*,  $p < 0.05$ , colonne 1,2,3 vs 4). (B) Le cellule LLC-B appena isolate sono state trasfettate mediante nucleofezione sia con il controllo negativo (barra bianca) che con siRNA per procasp8 (barra scura), incubate per 48 ore in terreno completo, e in seguito incubate per 0 oppure 24 ore in presenza (pannello a destra) o in assenza (pannello a sinistra) di PP2 10 mM. L'apoptosi cellulare è stata poi analizzata mediante citofluorimetria a flusso con annessina V-PI ed espressa come percentuale media  $\pm$  DS dell'apoptosi precoce e tardiva da 3 esperimenti separati condotti in triplo su campioni da 16 pazienti appartenenti ai 2 diversi sottogruppi UM-LLC e M-LLC (pannelli di sinistra e di destra) composti ognuno da 8 campioni. Rispetto all'effetto di PP2, le differenze dovute al siRNA di procasp8 erano statisticamente significative (\*,  $p < 0.05$  oppure più alto valore di significatività). (C) Analisi di citofluorimetria a flusso con Annessina V-PI di 2 campioni rappresentativi dei gruppi UM-LLC e M-LLC nelle condizioni sperimentali mostrate in B, pannello a destra.*

Per valutare il ruolo assunto da questi eventi molecolari nella cascata apoptotica e definire ulteriormente il ruolo e la localizzazione di procaspasi 8, abbiamo analizzato il comportamento di alcuni fattori implicati nelle vie di apoptosi. In seguito al trattamento con siRNA di controllo e con PP2 (Fig.26A: colonne 5-8 vs 1-4), le cellule LLC-B hanno mostrato il taglio di procaspasi 8 e di caspasi 3, e di PARP, substrato ultimo di caspasi 3; ciò ad ulteriore conferma del controllo negativo esercitato da Lyn su caspasi 8. Inoltre, poiché la caspasi 8 è conosciuta come iniziatrice delle vie apoptotica intrinseca in risposta all'attivazione dei recettori di morte mediante taglio di Bid, un membro proapoptotico della famiglia Bcl2 contenente il dominio BH3 (il quale a sua volta media il danno mitocondriale e il rilascio di citocromo c nel citosol) [Kantari et al., 2011], dai campioni sopraccitati abbiamo purificato la frazione citosolica e quella mitocondriale, quindi abbiamo monitorato nel tempo, la distribuzione sub-cellulare del citocromo.

In modo interessante, abbiamo rilevato come il trattamento con PP2 ha causato anche un calo nel contenuto mitocondriale di citocromo c, con l'aumento parallelo del suo livello proteico nel citosol (Fig.26B: colonne 5-8 vs 1-4), evento quasi del tutto contrastato dal silenziamento di procaspasi 8, sottolineando il ruolo assunto da caspasi 8 nel mediare le molteplici vie apoptotiche. Risultati simili sono stati raggiunti usando dasatinib alle stesse condizioni sperimentali sopraccitate (dati non mostrati).

Questi dati indicano un possibile coinvolgimento della fosforilazione tirosinica nella preservazione dell'integrità mitocondriale delle cellule LLC-B, in particolare questa modificazione post-traduzionale impedisce il rilascio del citocromo c e la

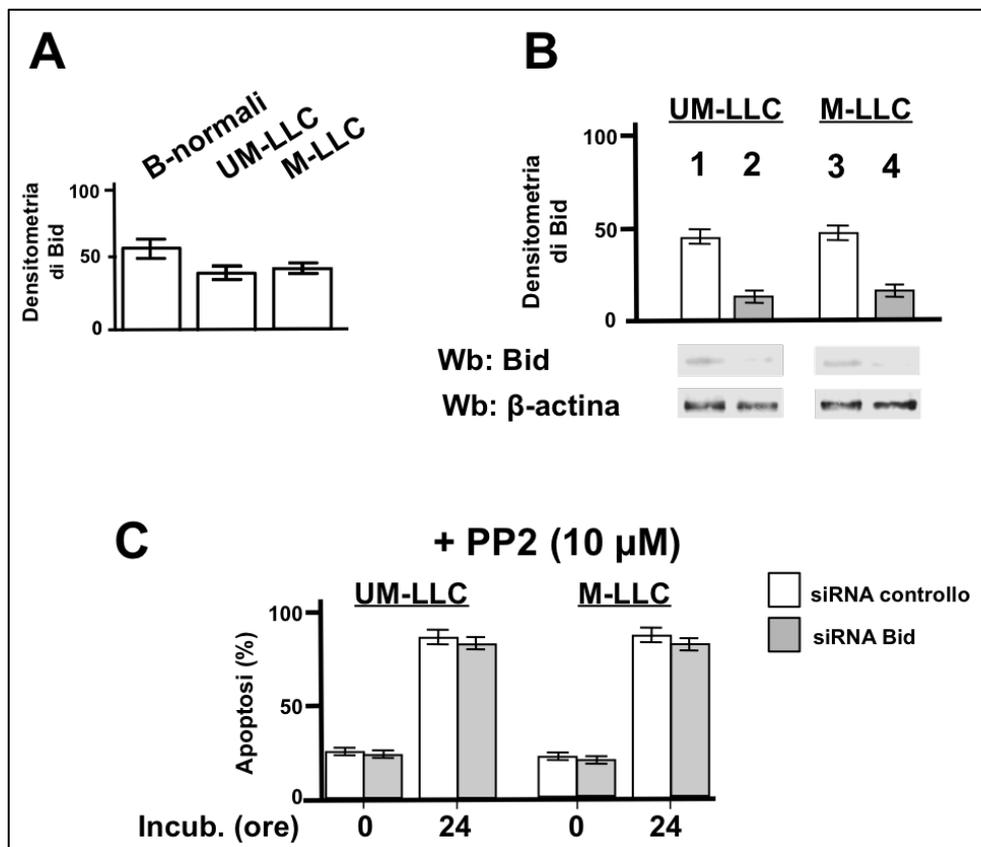
conseguente attivazione della via apoptotica intrinseca, la quale a sua volta è innescata dall'attivazione della stessa caspasi 8.



**Figura 26. L'apoptosi mediata da PP2 è contrastata dal silenziamento genico di procaspasi 8.** (A) Le cellule LLC-B appena isolate sono state trasfettate mediante nucleofezione sia con il siRNA di controllo (colonne 1-8) che con il siRNA di procasp-8 (9-16), incubate per 48 ore in terreno completo, e successivamente in presenza (colonne 5-8 e 13-16) oppure in assenza (colonne 1-4 e 9-12) di 10 mM PP2 per tempi diversi. Dopo questo trattamento, le cellule sono state lisate e analizzate mediante analisi Wb con gli anticorpi anti-procasp8, anti-caspasi-3, e anti-PARP e in seguito con anti-β-actina come controllo di carico. (B) Le cellule LLC-B appena isolate sono state trattate come descritto in A. Dopo il trattamento con PP2, le cellule sono state sottoposte a centrifugazione differenziale per separare le frazioni mitocondriale e citosolica. Quantità uguali di proteina sono state saggiate mediante analisi Wb con anticorpo anti-cit-c e con anti-aconitasi e anti-LDH per verificare la purezza delle frazioni.

Alla luce di questi dati, abbiamo tentato di valutare se l'asse caspasi 8-Bid fosse richiesto per la traslocazione del citocromo c al citosol in seguito a trattamento con PP2. La Figura 27 mostra che il livello proteico di Bid si è dimostrato leggermente più basso nelle LLC-B rispetto che nei linfociti B normali (Fig.27A) e che il silenziamento genico di Bid non previene l'apoptosi indotta da PP2 nelle cellule LLC-B (Fig.26B-C). Abbiamo inoltre verificato che il trattamento con PP2, non ha causato il taglio di Bid (dati non mostrati), ciò suggerisce che la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna dovuta all'attivazione

di caspasi 8, in queste condizioni sperimentali, è mediata da un meccanismo alternativo e da mediatori non ancora identificati. In modo particolare, il silenziamento di procaspasi 8 non altera la via apoptotica intrinseca posta a valle del taglio di Bid, sottolineando ulteriormente il ruolo di caspasi 8 nel processo apoptotico a più livelli e nelle vie di morte non canoniche. In ultima analisi, l'attivazione procaspasica dipende dall'inibizione di Lyn e avviene indipendentemente dal reclutamento dei recettori di morte. In tale processo di mancata apoptosi, è possibile supporre la compartecipazione di molecole non ancora identificate in grado di percepire il livello di fosforilazione tirosinica nella LLC-B.



**Figura 27. Il silenziamento genico di Bid non altera l'effetto apoptotico di PP2 nelle cellule LLC-B.** (A) I lisati totali di cellule B da 6 donatori sani e da 24 pazienti LLC-B sono stati analizzati mediante Wb con l'anticorpo anti-Bid e le membrane sono state poi incubate con l'anticorpo anti- $\beta$ -actina come controllo di carico. Le analisi densitometriche (unità arbitrarie) delle bande Wb sono mostrate nel pannello sinistro. (B) Le cellule LLC-B appena isolate sono state trasfettate mediante nucleofezione sia con il controllo negativo (colonne 1 e 3) che con il siRNA procaspasi 8 (colonne 2 e 4) e incubate per 48 ore in terreno completo. I lisati cellulari sono poi stati sottoposti ad analisi Wb con l'anticorpo anti-Bid e le membrane sono state reincubate con anti- $\beta$ -actina come controllo di carico. Nei lisati cellulari delle cellule silenziate per procaspasi 8,

*L'espressione di Bid era diminuita in modo significativo rispetto alle cellule trasfettate con il siRNA di controllo (\*,  $p < 0.05$ , colonne 1,2,3 vs 4). (C) Le cellule LLC-B appena isolate sono state trasfettate sia con il controllo negativo mediante nucleofezione ( $\square$ ) sia con il siRNA per Bid ( $\blacksquare$ ), coltivate per 48 ore in terreno completo e successivamente incubate per 0 oppure 24 ore in presenza di 10  $\mu\text{M}$  PP2. L'apoptosi cellulare è stata poi analizzata mediante citofluorimetria con il annessina V-PI, con l'analisi quadratica espressa come percentuale media  $\pm$  DS dell'apoptosi precoce e tardiva per tre esperimenti separati eseguiti in triplo a partire da 12 pazienti LLC-B appartenenti ai due sottogruppi diversi UM-LLC e M-LLC (rispettivamente, pannelli di sinistra e di destra). A confronto con l'effetto di PP2, i cambiamenti dovuti al siRNA per Bid non si sono dimostrati statisticamente significativi.*

#### **4 - Discussione**

In questo lavoro di dottorato, abbiamo dimostrato che nelle cellule LLC-B lo zimogeno di caspasi 8 (procaspasi 8) costituisce un substrato di Lyn, tirosin-chinasi che in tale patologia risulta sovra-espressa, è presente in modo anomalo nel citosol e mostra una alta attività costitutiva. La fosforilazione avviene a livello del residuo tirosinico 380 e porta alla regolazione negativa della funzione pro-apoptotica della caspasi 8, condizione che contribuisce alla difettiva apoptosi caratteristica della malattia.

La caspasi 8 è un membro della famiglia di cisteina-proteasi chiamate caspasi, questa proteina agisce come iniziatore della via apoptotica estrinseca ed interviene in molteplici processi di natura non apoptotica, come l'adesione, la migrazione, il differenziamento e la sopravvivenza cellulare [Launay et al., 2005].

Questa proteasi viene espressa a livello citosolico in forma di monomero inattivo mentre sulla membrana plasmatica viene attivata mediante il reclutamento sul complesso recettoriale DISC in seguito alla stimolazione dei recettori di morte CD95 e TRAIL. L'attivazione della procaspasi 8 è strettamente dipendente dalla sua struttura a multidominio, che presenta:

- un dominio DED (Death Effector Domain) all'estremità N-terminale;
- un pro-dominio, il quale consente l'interazione con una seconda molecola di procaspasi 8 che porta alla formazione di un dimerico attivo, oppure con proteine di tipo regolatorio o adattatrici come cFLIP e FADD, che prendono parte alla formazione del DISC;
- due subunità catalitiche al C-terminale chiamate subunità piccola e subunità grande, separate da una corta regione *linker* in cui si trova la Tyr380.

Il dimero di procaspasi 8 diventa il substrato di altri dimeri adiacenti, in seguito vengono rimossi la regione *linker* e il pro-dominio, e si forma l'eterotetramero attivo composto da due subunità larghe e due subunità piccole, le quali a loro volta possono processare bersagli posti a valle innescando la via apoptotica.

I nostri dati mostrano come, a differenza dei linfociti B normali dove la procaspasi 8 si presenta nel citosol sotto forma monomeric, nelle cellule LLC-B di entrambi i sottogruppi UM-LLC e M-LLC, questa proteasi si localizza quasi esclusivamente nel citosol sotto forma di omodimero inattivo. Il processo di assemblaggio sembra dipendere dalla fosforilazione della Tyr380, come dimostrato dallo stato assemblato della procaspasi 8 valutato mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità di glicerolo (Figura 21) e dalla dissociazione della sua forma dimerica dovuta alla defosforilazione ad opera di fosfatasi endogene che avviene nelle fasi di purificazione di caspasi 8 condotte in assenza di inibitori fosfatasi (Figura 23).

Abbiamo qui dimostrato come la Tyr380 della procaspasi 8 venga fosforilata dal *pool* di Lyn che prende parte al complesso citosolico aberrante stabilizzato da Hsp90 (Figura 16B). Infatti, la fosforilazione su Tyr380 viene annullata non solo in seguito al trattamento con l'inibitore SFK PP2 ma anche mediante l'uso di geldanamicina, inibitore di Hsp90, ciò induce la dissociazione del complesso e porta ad un calo della attività di Lyn citosolico [Trentin et al., 2008].

E' stato dimostrato che la fosforilazione di Tyr380, oltre a inibire l'attività caspatica [Cursi et al., 2006], può promuovere nuove interazioni proteina-proteina per mezzo delle quali la procaspasi 8 partecipa ad ulteriori vie di trasduzione del segnale non direttamente coinvolte nell'apoptosi. Un esempio è costituito dal processo di adesione e motilità cellulare in cui la procaspasi 8, fosforilata in Tyr380, lega il dominio SH2 della subunità p85 della PI3-K [Senft et al., 2007]. Nel caso della patologia in esame, è stato dimostrato che la procaspasi 8 non interagisce né con p85, né con altri ligandi come c-FLIP [van Raam et al., 2012] o membri della famiglia Src, che potrebbero legarsi ad essa mediante il dominio DED [Finlay et al., 2007]. A tale proposito, possiamo ipotizzare che la fosforilazione di Tyr380 favorisca l'omodimerizzazione e l'inibizione dell'attività caspatica mediante un riarrangiamento strutturale che impedisce il legame dei

potenziali interattori e porta alla segregazione a livello citosolico della procaspasi 8.

I risultati sopra riportati dimostrano che l'apoptosi caspasi-dipendente indotta dagli inibitori diretti di Lyn (PP2) sembra essere indipendente dalle cascate apoptotiche mediate dai recettori di morte [Jia et al., 2008]; nei linfociti LLC-B queste vie sono per la maggior parte silenti poiché il recettore Fas (CD95) risulta poco o per nulla espresso e refrattario [Kamihira et al., 1997; MacFarlane et al., 2002; Romano et al., 2005].

Abbiamo poi notato come l'inibizione di tipo farmacologico e/o genetico della procaspasi 8 riduca enormemente l'apoptosi indotta da PP2, a ulteriore conferma del fatto che la procaspasi 8, in quanto substrato di Lyn citosolico, è cruciale per il mantenimento della vitalità delle cellule leucemiche.

L'importanza dell'asse inibitorio Lyn/procaspasi 8 viene evidenziata dagli effetti riscontrati in seguito ad attivazione caspasi PP2-dipendente; in particolare il taglio di PARP indica l'attivazione della caspasi 3 mentre il rilascio di citocromo c segnala il coinvolgimento della caspasi 8 stessa nella propagazione degli stimoli pro-apoptotici dal citosol ai mitocondri. Sono necessari ulteriori studi per chiarire come la defosforilazione di Tyr380 porti alla completa attivazione della procaspasi con una conformazione di tipo eterotetrameric. A tale proposito, mentre la dimerizzazione e l'inibizione della procaspasi 8 può essere considerato un effetto diretto della aberrante attività di Lyn nella LLC-B, non è chiaro se l'attivazione della procaspasi 8 in seguito all'inibizione mediata da Lyn sia dovuta all'autoclivaggio o possa implicare la partecipazione diretta o indiretta di altri fattori sensibili alla diminuzione della tirosin-fosforilazione. Comunque, il calo nella fosforilazione tirosinica indotto da PP2 che porta alla morte cellulare rappresenta uno stimolo alternativo all'attivazione della procaspasi 8 mediata dal complesso DISC, la cui formazione è inadeguata nelle cellule LLC-B [MacFarlane et al., 2002]. Infatti, in questa malattia è stato recentemente proposto l'esistenza di una via non convenzionale che porta all'attivazione della procaspasi 8 in seguito a stress del reticolo endoplasmatico attraverso clivaggio mediato dalla caspasi 4; in questo caso la caspasi 8 rappresenta un elemento di unione tra lo stress al RE e la cascata apoptotica intrinseca [Rosati et al., 2010].

I dati finora descritti sottolineano ancora una volta la funzione anti-apoptotica assunta da Lyn come parte integrante del complesso citosolico caratteristico di tale patologia [Trentin et al., 2008], e pongono in rilievo il ruolo dei substrati di Lyn coinvolti nella mancata apoptosi cellulare soprattutto in relazione alla tirosin-fosforilazione del sub-proteoma citosolico che mostra un ampio spettro di bersagli potenziali.

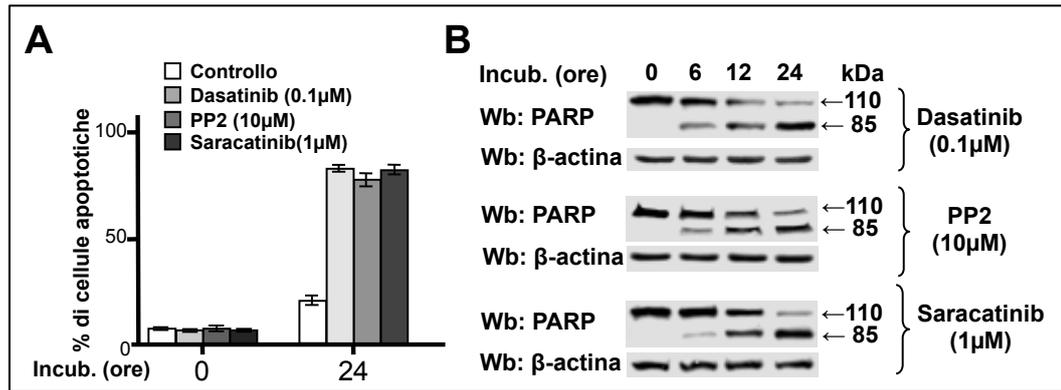
In questo caso, l'individuazione della procaspasi 8 è dipesa dalle condizioni restrittive imposte dai parametri sperimentali, come il ristretto intervallo di pI, la localizzazione citosolica, il coinvolgimento dell'apoptosi e la fosforilazione mediata da SFK. In futuro, la modifica opportuna di questi criteri potrebbe consentire l'identificazione di un più ampio numero di substrati Lyn, specialmente se supportata da un approccio di tipo proteomico.

Nell'insieme, nelle cellule LLC-B gran parte della resistenza all'apoptosi è probabilmente dovuta all'inibizione dell'attività proteolitica della caspasi 8 mediata dalla attività della forma citosolica aberrante di Lyn. Infatti, l'inibizione di Lyn e la conseguente attivazione della caspasi 8 permettono di ripristinare l'apoptosi delle cellule leucemiche. Per tale motivo, il dimero procaspasico fosforilato tipico della LLC-B potrebbe costituire un nuovo bersaglio molecolare per lo sviluppo di molecole capaci di riattivarlo, aprendo così nuove prospettive nel trattamento di tale patologia

## **PARTE SECONDA**

### **1 - Gli inibitori di SFK determinano una riduzione della fosforilazione Ser/Thr di molecole che sostengono la sopravvivenza delle cellule LLC-B**

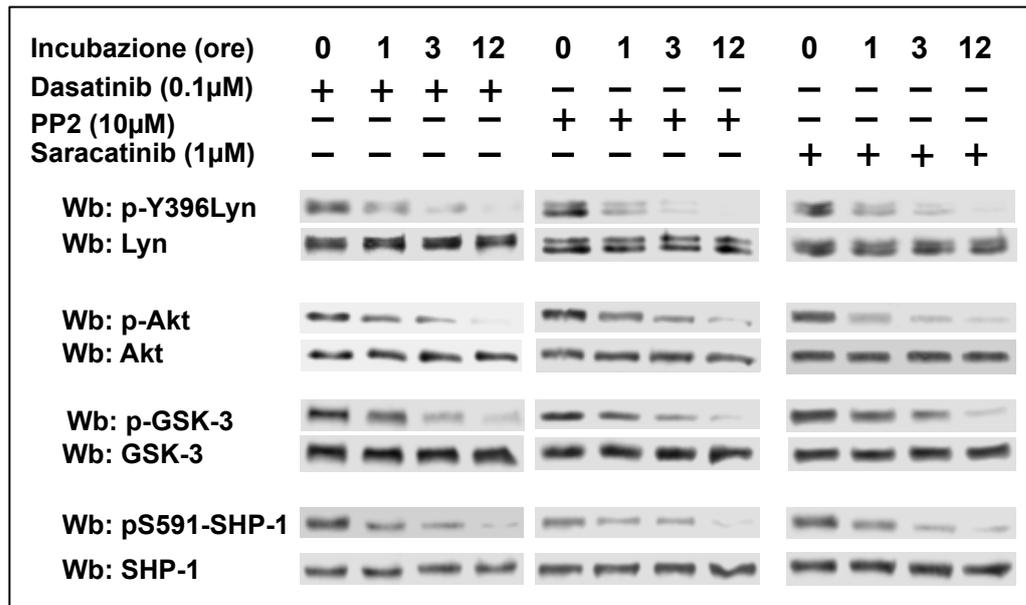
A questo punto, la nostra attenzione si è focalizzata sul secondo substrato identificato mediante l'analisi 2D e l'approccio bioinformatico, la protein fosfatasi PP2A. A spingerci ad indagare il possibile coinvolgimento di PP2A nei meccanismi di resistenza all'apoptosi dei linfociti leucemici, avvalorando così il risultato ottenuto dall'analisi bioinformatica, è stata l'evidenza che gli inibitori SFK determinavano un calo nei livelli di fosforilazione Ser/Thr di molecole chiave per la sopravvivenza del linfocita patologico. In letteratura è noto che l'inibitore dasatinib induce un calo drastico nella fosforilazione di specifici residui serinici di protein chinasi implicate nella sopravvivenza cellulare quali Akt, ERK1/2 e p38, senza però alterarne l'attività chinastica [McCaig et al., 2012]. Noi abbiamo innanzitutto dimostrato che la capacità di dasatinib di inibire Akt, una delle principali chinasi attivate nelle cellule LLC-B, è condivisa da altri inibitori SFK, PP2 e saracatinib [Rothschild et al., 2010]. L'inibizione di Akt è stata valutata mediante lo stato di fosforilazione di Ser473 di Akt (pAkt) [Song et al., 2005] e mediante quello di Ser9 di GSK-3 $\beta$  (pGSK-3 $\beta$ ) [Mishra, 2010], proteina substrato di Akt che regola la stabilità di  $\beta$ -catenina. A questo scopo, le cellule B isolate da 30 pazienti LLC-B, sono state incubate in presenza o in assenza di dasatinib (0.1  $\mu$ M), PP2 (10  $\mu$ M) e saracatinib (1  $\mu$ M) a tempi diversi. Come previsto, dopo 24 ore di trattamento tutti i tre composti hanno indotto la morte cellulare (Figura 28A), mediante un meccanismo caspasi-dipendente, come conferma il taglio di PARP, substrato ultimo di caspasi 3 (Figura 28B).



**Figura 28. Apoptosi indotta dal trattamento con inibitori SFK.** (A) Le cellule B isolate da pazienti di LLC-B sono state incubate in presenza o in assenza degli inibitori SFK 0.1 μM dasatinib, 10 μM PP2 e 1 μM saracatinib per 24 ore. La vitalità cellulare è stata valutata con analisi al citofluorimetro. I valori riportati rappresentano la media ± DS di esperimenti condotti su 30 pazienti LLC-B. (B) A tempi differenti d'incubazione le cellule sono state lisate e analizzate mediante WB con gli anticorpi anti-PARP ed anti β-actina come controllo di carico.

A livello molecolare, abbiamo inoltre riscontrato una notevole riduzione della fosforilazione serinica di Akt e di Gsk-3β (Fig.29), evento che agisce in senso opposto sull'attività delle due proteine, inibendo Akt e attivando Gsk-3. Questa evidenza sperimentale è stata riscontrata in associazione al calo della fosforilazione in Tyr396 nel *loop* di attivazione di Lyn (Fig.28, pannelli medi), ciò suggerisce che Lyn può direttamente influire sulla regolazione di molecole segnale poste a valle nelle cellule LLC-B.

Inoltre, abbiamo rivolto la nostra attenzione a SHP-1, una tirosin-fosfatasi la cui azione viene modulata da Lyn ed è implicata nel processo di mancata apoptosi tipico della malattia. Nelle cellule LLC-B, SHP-1 localizza in due *pools*, uno fosforilato e ancorato alla membrana plasmatica in conformazione attiva e l'altro localizzato nel citosol in conformazione inibita e fosforilata in Ser591 [Tibaldi et al., 2011]. In seguito al trattamento con inibitori SFK abbiamo riscontrato un calo nel livello di fosforilazione di SHP-1 in Ser591, evento che determina l'attivazione della fosfatasi stessa e che comporta il calo nella fosforilazione tirosinica riscontrata sperimentalmente a livello citosolico [Trentin et al., 2008].



**Figura 29. Effetto degli inibitori SFK sulla fosforilazione serinica di substrati di Ser/Thr fosfatasi.** Le cellule di pazienti LLC-B sono state incubate in presenza o in assenza degli inibitori SFK, dasatinib, PP2 e saracatinib. A tempi differenti di incubazione le cellule sono lisate e analizzate mediante WB con i seguenti anticorpi: anti-pY396Lyn, anti-Lyn, anti-p-Akt, anti-Akt, anti-pGSK-3 $\beta$ , anti-GSK-3 $\beta$ , anti-pS591-SHP-1 e anti-SHP-1. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti condotti separatamente su 30 pazienti LLC-B.

## 2 - L'inibizione di Serina-Treonina fosfatasi contrasta l'azione degli inibitori SFK

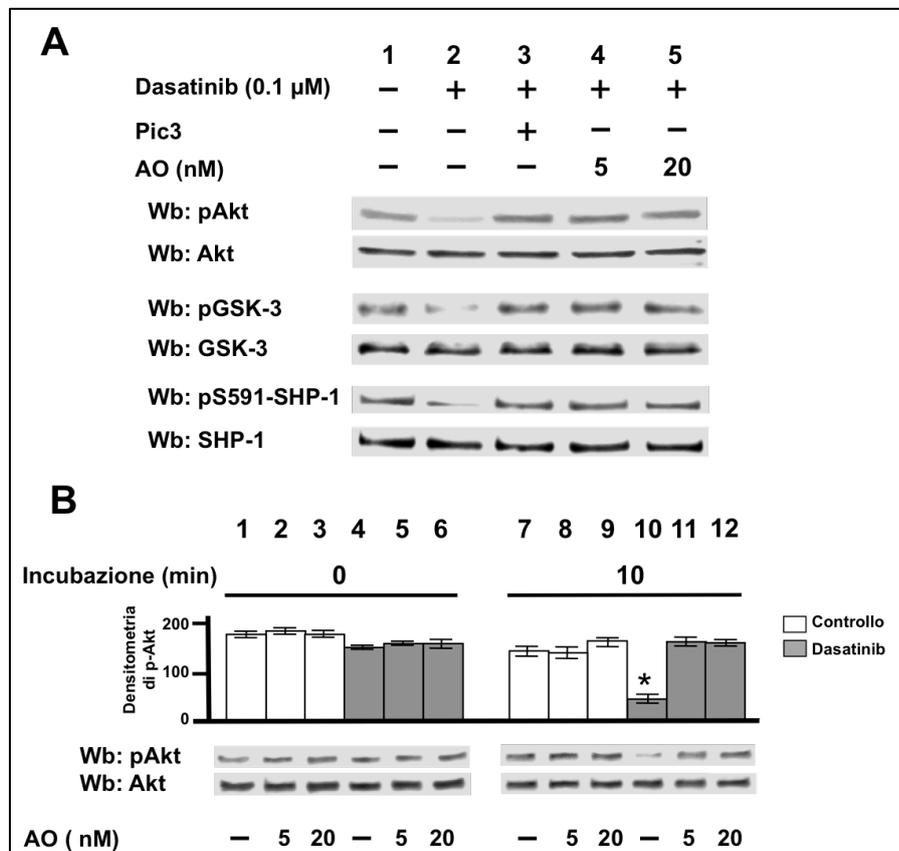
A fine di correlare l'attività anomala di Lyn con i livelli di Ser/Thr fosforilazione degli enzimi sopraccitati, abbiamo considerato i fattori che definiscono l'equilibrio di fosforilazione/defosforilazione nelle cellule LLC-B.

Perciò abbiamo incubato i linfociti B leucemici con dasatinib in presenza e in assenza di un *cocktail* commerciale di inibitori fosfatasi ad ampio spettro (Pic3) oppure a concentrazioni crescenti di acido okadaico (AO), quest'ultimo inibitore quasi esclusivo di due serina/treonina fosfatasi ubiquitarie quali PP1 e PP2A. L'AO è descritto inibire PP2A a concentrazioni nell'ordine del nanomolare, mentre inibisce PP1 in misura molto minore [Fernández et al., 2002; Swingle et al., 2007].

La Figura 30A mostra come sia Pic3 che AO siano entrambi in grado di contrastare totalmente la defosforilazione di Akt, Gsk-3 $\beta$  e SHP-1 indotta da dasatinib, ciò indica che Lyn può contribuire all'inibizione di un'attività

fosfatase. Risultati simili sono stati ottenuti impiegando gli inibitori SFK PP2 e saracatinib (dati non mostrati).

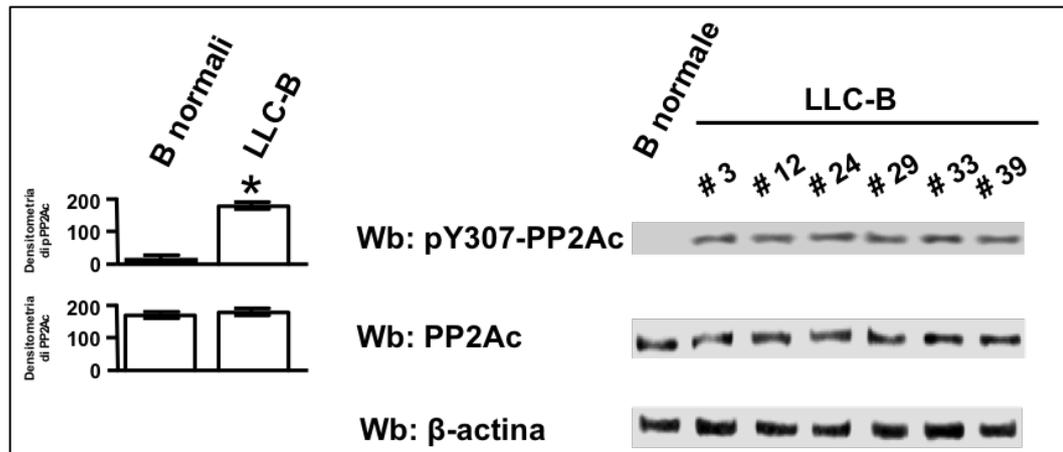
Inoltre, per capire se il trattamento con dasatinib e quindi l'inibizione di Lyn potessero attivare una fosfatasi inibita da AO, abbiamo testato l'attività fosfatase a concentrazioni crescenti di AO in lisati totali di cellule LLC-B precedentemente trattate o meno con dasatinib (Fig.30B). Valutando il substrato proteico pAkt ottenuto in seguito ad immunoprecipitazione di pAkt dai lisati totali di cellule LLC-B isolate (Fig.30B), abbiamo osservato che l'attività fosfatase indotta dal trattamento con dasatinib viene inibita da AO alla concentrazione 5 nM (Fig.30B: colonna 11). Questa evidenza sperimentale potrebbe indicare un diretto coinvolgimento di PP2A nella defosforilazione indotta da dasatinib. Questa ipotesi è inoltre in accordo con la regolazione negativa di PP2A mediata da fosforilazione tirosinica a carico di numerose tirosin-chinasi, tra queste, quelle appartenenti alla famiglia Src [Chen et al., 1992] Per questo motivo la fosfatasi PP2A potrebbe rappresentare uno dei potenziali bersagli di Lyn nell'ambito della leucemia linfatica cronica.



**Figura 30. Effetto di dasatinib e di inibitori di Ser/Thr fosfatasi sulla fosforilazione di substrati Ser/Thr fosfatasi.** (A) Le cellule di 20 pazienti LLC-B sono state incubate per 8 ore in presenza o assenza di 1  $\mu$ M dasatinib, 1x Pic3 e 5 nM, 20 nM acido okadaico (AO), sottoposte ad SDS-PAGE e analizzate con anticorpi anti-pAkt, anti-Akt, anti-pGSK-3 $\beta$ , anti-GSK-3 $\beta$ , anti-pS591-SHP-1 e anti-SHP-1. (B) I lisati totali sono stati inoltre sottoposti ad un saggio di attività fosfataseica in assenza o presenza di concentrazioni crescenti di AO usando pAkt immunoprecipitato da cellule LLC-B. Dopo tale trattamento, i campioni sono stati analizzati mediante Wb e incubati con anticorpo anti-pAkt e anti-Akt. Le bande sono state esaminate attraverso analisi densitometrica (unità arbitrarie). I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  DS di quattro esperimenti condotti.

### **3 - PP2A è ugualmente espressa e fosforilata in Tyr307 nelle cellule LLC-B**

PP2A è un eterotrimerico che consiste di una subunità A strutturale di 65 kDa, una subunità C catalitica di 36 kDa (PP2Ac) e una subunità regolatoria B variabile. Essa è soggetta a un complesso meccanismo regolatorio che le conferisce un'alta specificità funzionale [Mumby, 2007; Chen et al., 1992, Seshacharyulu et al., 2013, Chen et al., 2013; Perrotti e Neviani, 2013]. Questa regolazione comprende interazioni proteina-proteina, modifiche post-traduzionali e compartimentazione cellulare. Tra le interazioni proteiche che regolano PP2A, è stato dimostrato che ad esempio, il legame diretto di PP2Ac con molecole endogene, quali I1PP2A e I2PP2A/SET agisce negativamente sull'attività fosfataseica [Christensen et al., 2011]. Un altro sistema di modulazione è rappresentato dalle modifiche post-traduzionali nella subunità catalitica quali la metilazione di Leu309 che induce l'aumento dell'attività fosfataseica, e la fosforilazione di Tyr307 che ne causa l'inattivazione transiente [Chen et al., 1992, Seshacharyulu et al., 2013]. A tal proposito, la recente letteratura attribuisce un ruolo alle chinasi Src nella regolazione negativa di PP2A in diversi tumori [Le Guelte et al., 2012]. Per valutare la presenza di questo processo nell'ambito della LLC-B, abbiamo quindi esaminato lo stato di fosforilazione in Tyr307 di PP2Ac in tutti i pazienti esaminati comparandolo a quello riscontrato in donatori sani. La Figura 31 mostra che PP2Ac è fosforilata in Tyr307 in tutti i lisati cellulari di cellule leucemiche, in modo indipendente dallo stato mutazionale dei geni IGVH; diversamente nei donatori sani la fosforilazione non è rilevabile. In entrambi i gruppi, il livello proteico di PP2Ac è uguale.



**Figura 31.** Analisi del livello proteico e dello stato di fosforilazione in Tyr307 di PP2Ac in diversi pazienti LLC-B. I linfociti B normali e le cellule LLC-B sono stati risolti mediante SDS-PAGE e sottoposti a Wb, infine rivelati con anticorpo anti-pY307PP2Ac e anti-PP2Ac. La rivelazione anti-β-actina è stata usata come controllo (pannello sinistro). L'analisi densitometrica mostrata nel pannello di destra è rappresentativa di tre esperimenti condotti su 30 pazienti e 6 donatori sani.

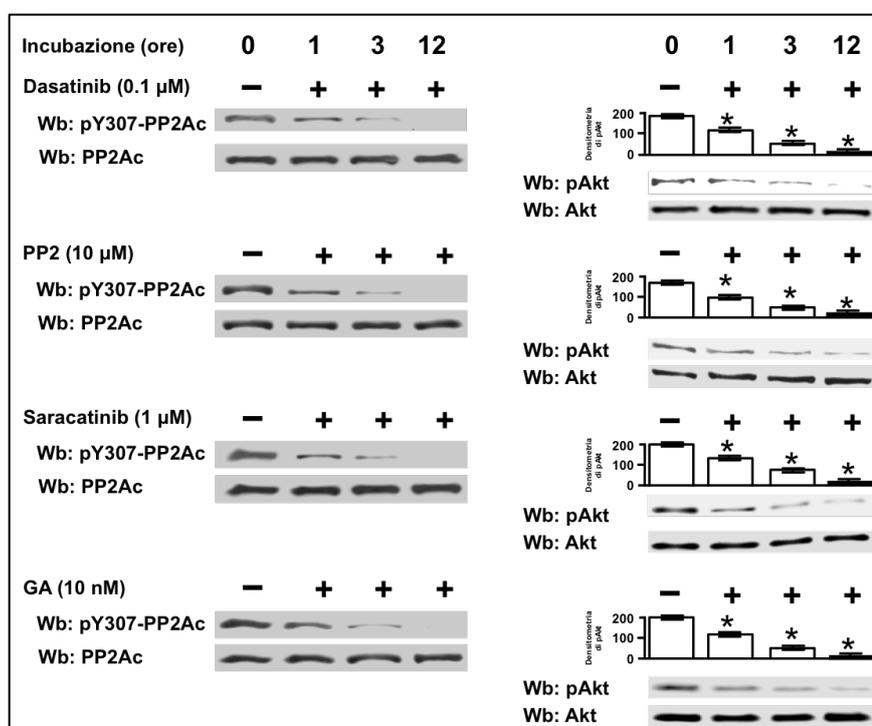
#### **4 - Nelle cellule LLC-B PP2Ac è fosforilata dalla forma citosolica di Lyn**

I dati a nostra disposizione dimostrano che nelle cellule LLC-B, PP2A si trova in forma inibita a causa della fosforilazione sul residuo Tyr307 (pY307PP2Ac). Abbiamo quindi dimostrato come tale fosforilazione cali drasticamente in seguito al trattamento con gli inibitori di Lyn dasatinib, PP2 e saracatinib (Fig.32, pannelli a sinistra). Ciò correla con un ripristino dell'attività fosfatase di PP2A apprezzabile monitorando la de-fosforilazione del suo substrato pAkt (Fig.32, pannelli a destra).

Per verificare quale delle due sottopopolazioni di Lyn, se quella citosolica o quella di membrana, sia responsabile della fosforilazione di PP2A, abbiamo trattato le cellule LLC-B con geldanamicina (GA), che ricordo essere un inibitore di Hsp90, la proteina *chaperone* che stabilizza Lyn in conformazione attiva all'interno di un complesso citosolico aberrante. Come in precedenza dimostrato [Trentin et al., 2008], questo agente causa l'inattivazione selettiva della forma citosolica di Lyn attraverso la rottura del complesso stesso, dimostrandosi efficace quanto dasatinib, PP2 e saracatinib nell'abolire l'attività tirosin-chinasica operata da Lyn nelle cellule LLC-B. Questo trattamento induce non solo un calo nella

fosforilazione di Tyr307 di PP2Ac (Fig.32, pannello sinistro), ma anche la defosforilazione di pAkt (Fig.32, pannello destro), confermando il ruolo dell'attività anomala di Lyn nel citosol delle cellule LLC-B. Risultati sovrapponibili sono stati condotti usando un kit commerciale per monitorare l'attività fosfatase di PP2A (dati non mostrati).

Le evidenze sperimentali qui riportate avvalorano inoltre i dati ottenuti mediante l'approccio bioinformatico impiegato per l'identificazione di caspasi 8 e PP2A quali substrati dell'anomala attività di Lyn e identificano in PP2A un ulteriore substrato dell'anomala attività di Lyn nella LLC-B.

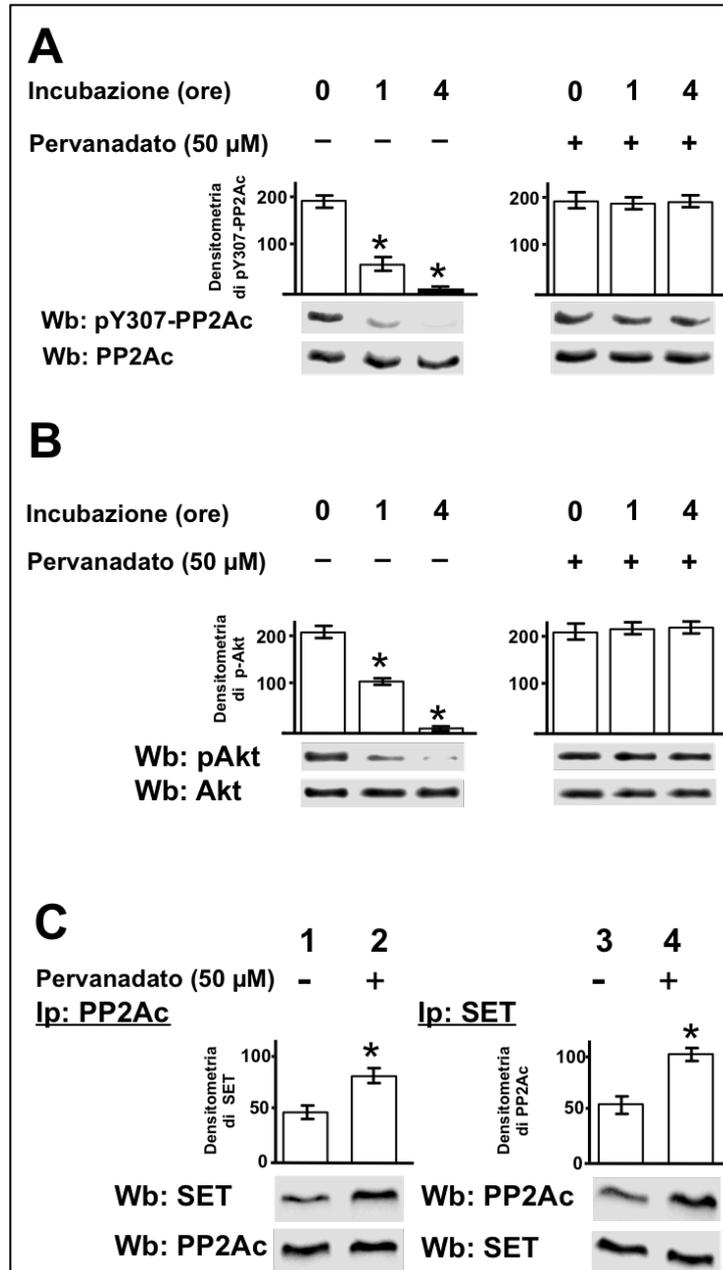


**Figura 32. Stato di fosforilazione di PP2Ac in cellule LLC-B trattate con inibitori SFK e GA.**  
 (A) Le cellule LLC-B sono state incubate a tempi differenti con gli inibitori SFK 1 μM dasatinib, 10 μM PP2 e 1 μM saracatinib e con 10 nM geldanamicina (GA). Le cellule sono state lisate ed è stata eseguita analisi Wb con anticorpi anti-pY307-PP2Ac e anti-PP2Ac (pannello sinistro) oppure sottoposte ad un saggio di attività fosfatase per 10 minuti a 37°C usando pAkt ottenuta da immunoprecipitati di cellule LLC-B (pannello destro). In questo caso, i campioni sono stati analizzati con gli anticorpi specifici ed è stata condotta l'analisi densitometrica delle bande. La figura è rappresentativa di quattro esperimenti condotti in singolo.

## **5 - Il ruolo della fosforilazione di PP2A in Tyr307 nell'associazione tra PP2A e I2PP2A/SET**

Per valutare l'effetto di pTyr307 nella complessa regolazione di PP2A, in primo luogo abbiamo incubato le cellule LLC-B in presenza e in assenza di pervanadato, inibitore irreversibile delle tirosin-fosfatasi [Huyer et al., 1997] per tempi differenti, e in seguito valutato il livello di fosforilazione in Tyr307 mediante Wb da lisati cellulari totali. Mentre il trattamento con pervanadato previene la defosforilazione di pTyr307 (Fig.33A: pannello a destra), i campioni non trattati hanno mostrato un calo notevole nella fosforilazione del residuo tirosinico (Fig.33A: pannello a sinistra).

A questo punto ci siamo chiesti se la fosforilazione in Tyr307 di PP2Ac nelle cellule LLC-B potesse avere azione inibitoria in quanto tale, come già descritto da altri [Chen et al., 1992], oppure essere associata ad altri meccanismi regolatori [Seshacharyulu et al., 2013, Chen et al., 2013; Perrotti et al., 2013]. In particolare, è stato dimostrato che l'inibitore I2PP2A/SET, è sovra-espresso nelle cellule LLC-B primarie ed esercita il suo potenziale oncogenico mediante l'inibizione di PP2A [Christensen et al., 2011]. Come mostrato nella Figura 32B, abbiamo riscontrato una stretta correlazione tra lo stato fosforilato di Tyr307 e l'attività fosfataseica mediante l'uso del substrato di PP2A pAkt, ottenuta immunoprecipitando la proteina dal citosol delle cellule LLC-B. Il blocco delle tirosin-fosfatasi nei lisati cellulari mediato dal pervanadato comporta la mancata defosforilazione di Tyr307 e quindi l'inattivazione dell'attività catalitica di PP2A. Inoltre, per stabilire se l'evento di fosforilazione fosse correlato all'interazione di PP2A con l'oncoproteina I2PP2A/SET, abbiamo immunoprecipitato PP2Ac, o in alternativa SET da lisati totali di cellule leucemiche trattate o meno con pervanadato e abbiamo eseguito Western blot con anticorpi anti-PP2Ac e anti-SET. La Figura 32C mostra che SET e PP2Ac co-immunoprecipitano in grande quantità nei lisati delle cellule trattate con pervanadato piuttosto che in quelli non trattati, indicando che la presenza della fosforilazione in Tyr307 stabilizza il complesso proteico PP2A/SET, ciò porta a dedurre che la fosforilazione pTyr307 aumenta la funzione inibitoria di SET su PP2A.



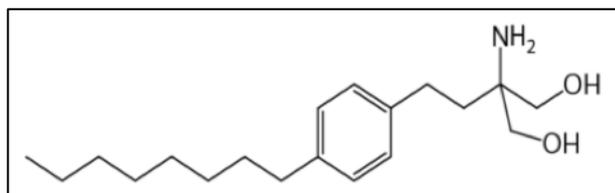
**Figura 33. Ruolo della fosforilazione di PP2Ac in Tyr307 nell'associazione PP2A-SET.**

(A) Le cellule LLC-B isolate da 20 pazienti sono state trattate o meno con pervanadato 50 μM. (B) I linfociti sono stati lisati a tempi diversi d'incubazione e analizzati mediante WB con anticorpi anti pY307-PP2Ac e anti-PP2A e con anticorpi anti-p-Akt e anti-Akt. (C) Dai lisati di cellule preincubate o meno con pervanadato è stata eseguita l'immunoprecipitazione con anticorpi anti PP2Ac e anti-SET, seguita da analisi Wb. I valori riportati rappresentano la media ± DS dall'analisi densitometrica delle bande Wb ottenute dagli esperimenti condotti in triplo.

## 6 - L'effetto di FTY720 sull'associazione del complesso PP2A/SET

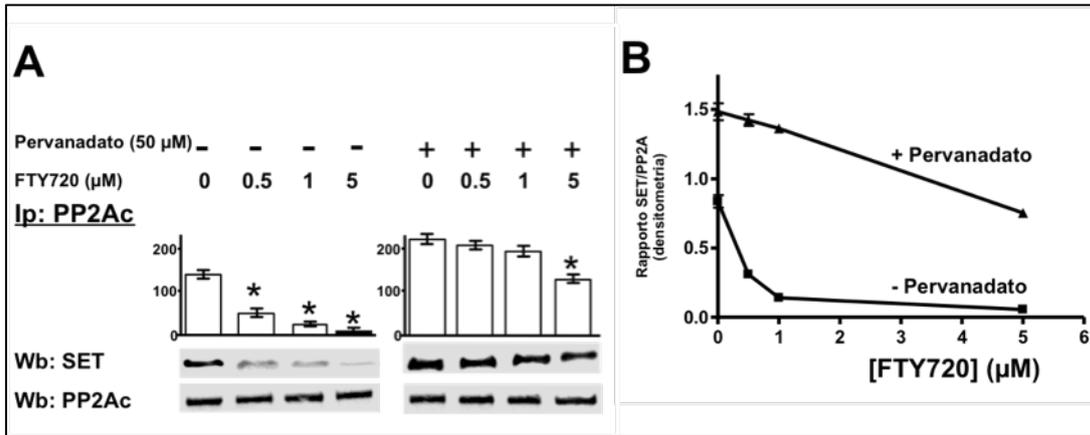
FTY720 (fingolimod, Fig.34) è un analogo della sfingosina usato nel trattamento delle forme recidivanti di sclerosi multipla e contro la reazione di rigetto dopo

trapianto renale; esso è impiegato come farmaco immunosoppressore poiché una volta fosforilato da sfingosina-chinasi-2, costituisce un antagonista funzionale dei recettori della sfingosina-1-fosfato (S1PRs) [Pelletier et al., 2011; Pitman et al., 2012; Cyster et al., 2012]. Questo agente ha inoltre dimostrato proprietà anti-tumorali nelle malattie oncoematologiche, poiché capace di riattivare PP2A interferendo nel complesso PP2A/SET [Saddoughi et al., 2013].



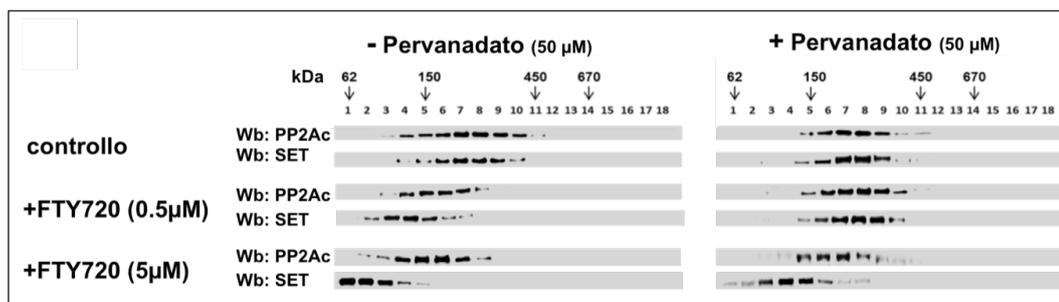
**Figura 34. Struttura chimica di FTY720 (fingolimod).**

Considerate le proprietà di FTY720, abbiamo quindi valutato il ruolo assunto della fosforilazione di PP2Ac in Tyr307 nell'ambito dell'associazione tra SET e PP2A. Per questo motivo, il citosol ottenuto da cellule LLC-B trattate o meno con pervanadato è stato incubato con concentrazioni crescenti di FTY720 (0-5  $\mu$ M), e in seguito sottoposto sia a immunoprecipitazione con anticorpo anti-PP2A, sia a separazione mediante ultracentrifugazione su di un gradiente lineare di glicerolo, entrambi seguiti da analisi con anticorpi anti SET e anti-PP2A. La Figura 35A dimostra che il trattamento con concentrazioni crescenti di FTY720 induce una diminuzione dell'associazione SET/PP2A negli immunoprecipitati da cellule LLC-B non trattate. E' possibile notare invece, che SET e PP2Ac co-immunoprecipitano in misura maggiore quando è preservata la fosforilazione mediante il trattamento con pervanadato (Fig.35A-B). Questo dato sottolinea ulteriormente l'importante ruolo svolto da questa modificazione post-traduzionale nella stabilizzazione dell'interazione tra PP2A e I2PP2A/SET.



**Figura 35. Effetto del trattamento con FTY720 in presenza o in assenza d'inibizione tirosin-chinasica.** (A) Sono state eseguite delle immunoprecipitazioni con anticorpi anti-SET e anti-PP2Ac a partire dai linfociti LLC-B trattati o meno con 50  $\mu$ M pervanadato e con concentrazioni crescenti di FTY720. Gli immunoprecipitati sono stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati poi con i rispettivi anticorpi. E' stata quindi eseguita l'analisi densitometrica delle bande Wb. (B) Grafico del rapporto dei valori di densitometria di SET e PP2Ac del quadro B.

Allo scopo di valutare ulteriormente lo stato di associazione tra PP2A e I2PP2A/SET, il citosol è stato poi sottoposto a ultracentrifugazione in gradiente lineare di glicerolo (Fig.36) e le singole frazioni sono state saggiate con i rispettivi anticorpi per rivelare la presenza delle due proteine. I nostri dati mostrano che nei campioni di controllo, I2PP2A/SET e PP2Ac vengono entrambi rivelati a un peso molecolare apparente di circa 220 kDa (Fig.36, pannelli superiori). L'incubazione del citosol con FTY720 comporta invece una differente distribuzione, lungo la scala di densità determinata dal gradiente di glicerolo, di PP2Ac e I2PP2A/SET, distribuzione che appare influenzata anche dal pre-trattamento con pervanadato. Infatti, i campioni trattati con il farmaco (+FTY720) e incubati con pervanadato (pannelli in basso a sinistra) mostrano una variazione rispetto al peso molecolare atteso per le singole proteine dissociate. Alla concentrazione di FTY720 più alta (5  $\mu$ M) questa differente distribuzione si nota in modo molto marcato (pannelli in basso). Queste evidenze sperimentali confermano ancora una volta che nelle cellule LLC-B la fosforilazione in Tyr307 da parte di Lyn contribuisce significativamente alla stabilità dell'interazione tra PP2A e I2PP2A/SET.

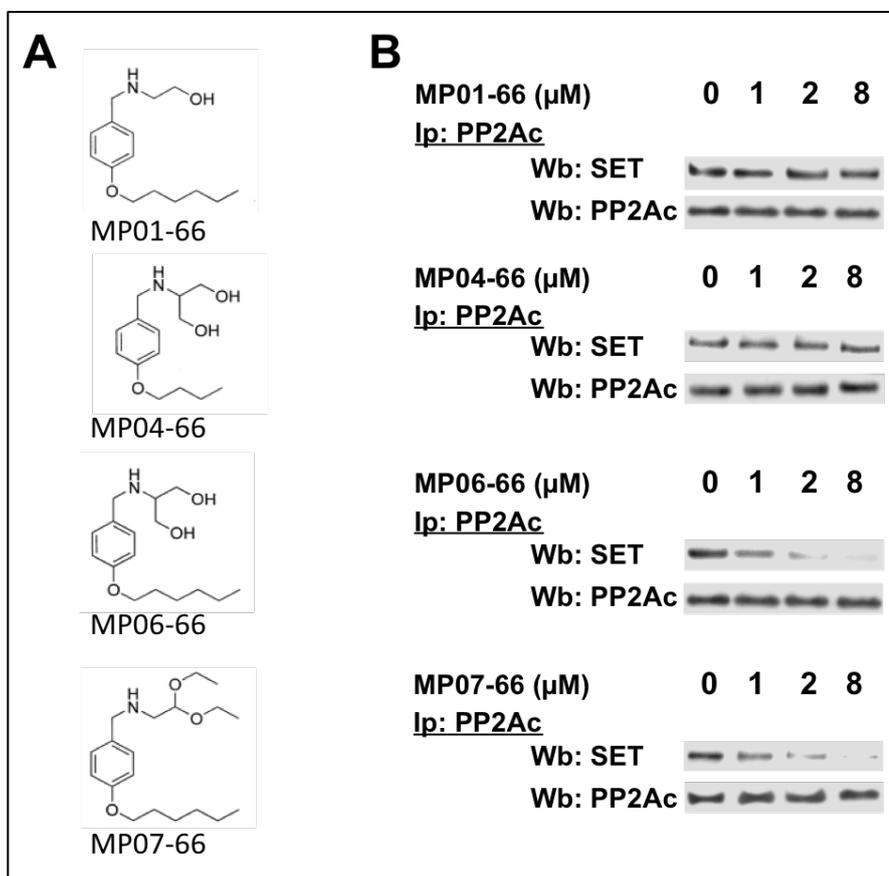


**Figura 36.** La fosforilazione tirosinica preserva il complesso PP2A/SET anche in seguito a trattamento con FTY720. Le cellule LLC-B sono state frazionate mediante ultracentrifugazione differenziale. Il citosol come tale o trattato con 0.5 e 5  $\mu$ M FTY720 in presenza o in assenza di 50  $\mu$ M pervanadato, è stato stratificato su gradiente di glicerolo. Le frazioni sono state raccolte dall'apice e saggiate con anticorpi anti-PP2Ac e anti-SET mediante analisi Wb. La figura è rappresentativa di tre esperimenti condotti sui campioni di 16 pazienti LLC-B.

## 7 - Effetto degli analoghi di FTY720 sulla stabilità del complesso PP2A/SET

L'azione immunosoppressiva dovuta alla degradazione di S1PR e la conseguente permanenza dei linfociti T negli organi linfatici secondari rende FTY720 non adatto per l'impiego come farmaco anti-tumorale. Questo problema ha portato allo sviluppo di OSU-2S, un composto derivato da FTY720 che mostra grande citotossicità verso il carcinoma epatocellulare e verso le LLC-B e che porta alla riattivazione di PP2A e all'apoptosi cellulare [Omar et al., 2011; Agarwal et al., 2014]. Pur inducendo un notevole effetto anti-tumorale, tale composto non induce gli effetti immunosoppressivi mediati dal recettore della sfingosina-1-fosfato. Per questo motivo, abbiamo formulato e sintetizzato alcuni analoghi di FTY720 e testato poi *in vitro* la loro eventuale attività anti-tumorale mediata dall'attivazione di PP2A; a differenza di FTY720 però i composti impiegati non sono fosforilabili da parte di sfingosina-chinasi-2 (SK2) e quindi non causano l'internalizzazione di S1P1 [Matloubian et al., 2004; Brunati et al., 2008]. La Figura 37A mostra quattro dei dieci analoghi formulati e modificati in modo opportuno, considerando le proprietà strutturali di FTY720 che mediano i suoi effetti. Come mostrato in Figura 36B, entrambi i composti MP06-66, il più simile alla molecola di FTY720, e MP07-66 si sono mostrati efficaci quanto FTY720 nello spiazzare SET da PP2A. Per comprendere il ruolo delle proprietà strutturali che contribuiscono all'azione di questi analoghi, sono stati sintetizzati due composti aggiuntivi, MP01-66 e MP04-66 modificando i gruppi chimici che caratterizzano FTY720.

Anche questi ultimi analoghi sono stati impiegati per il trattamento delle cellule LLC-B ma, a differenza degli altri, non hanno indotto la dissociazione del complesso PP2A/SET.

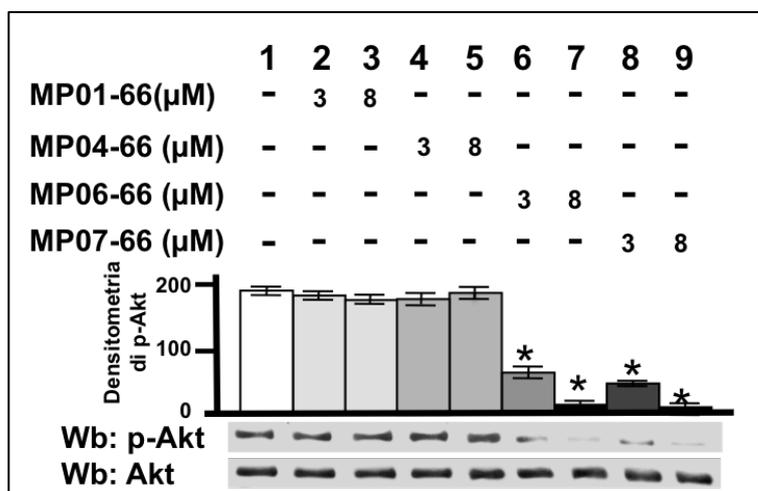


**Figura 37. Effetto degli analoghi di FTY720 sulla stabilità del complesso PP2A/SET.**

(A) Struttura chimica degli analoghi di FTY720. (B) Le cellule LLC-B isolate sono state trattate o meno con concentrazioni crescenti di MP01-66, MP04-66, MP06-66 o MP07-66 per 8 ore. Dopo questo trattamento, ogni campione è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-PP2Ac e gli immunocomplessi sono stati analizzati mediante Wb e rivelati con anti SET. Le membrane sono state poi sottoposte a stripping e rivelate con anticorpo anti PP2Ac.

In relazione al legame struttura-attività, tutti i composti formulati sono stati testati anche per la loro capacità di attivare PP2A. Il trattamento con MP06-66 e MP07-66 ha indotto la defosforilazione del suo substrato pAkt, mentre MP01-66 e MP04-66 si sono dimostrati inefficaci (Fig.38). Abbiamo poi verificato l'eventuale effetto di degli analoghi sul livello proteico di S1PRs di membrana plasmatica. Dei quattro composti, solo MP06-66 ha agito in modo simile a FTY720, causando una diminuzione di S1P1 a livello di membrana, questo ciò

non è invece accaduto impiegando MP01-66, MP04-66 e MP07-66 (dati non mostrati).

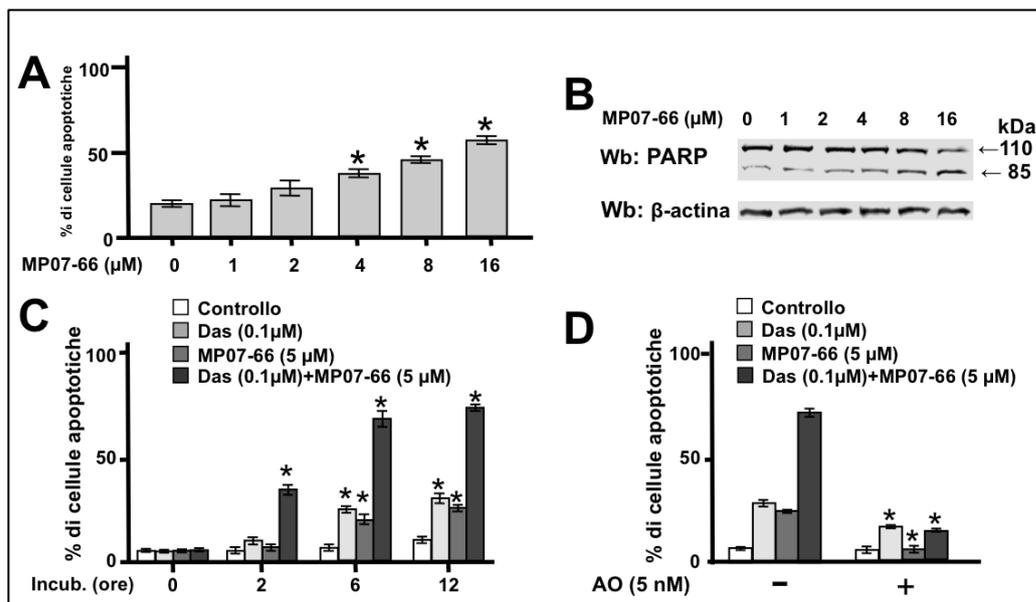


**Figura 38.** Effetto degli analoghi strutturali di FTY720 sull'attività fosfatase di PP2A. I lisati cellulari totali sono stati incubati con pAkt, ottenuta da immunoprecipitati di LLC-B, in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di MP01-66, MP04-66, MP06-66 o MP07-66 per 10 minuti a 37°C. Dopo questo trattamento, i campioni sono stati analizzati mediante Wb con gli anticorpi anti-p-Akt e anti-Akt. I valori riportati rappresentano la media  $\pm$  DS dell'analisi densitometrica delle bande Wb ottenute dagli esperimenti condotti in triplo sui campioni di 16 pazienti LLC-B.

## 8 - Dasatinib potenzia l'effetto pro-apoptotico di MP07-66 in modo sinergico

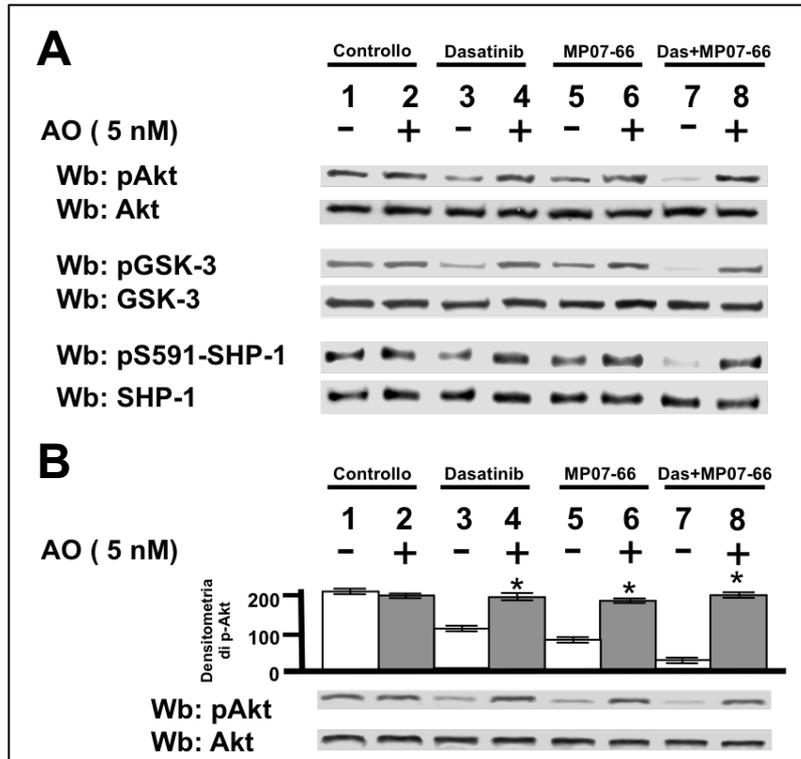
Dato che l'analogo MP07-66 mostra effetti simili a quelli indotti da FTY720 e da MP06-66, senza però causare l'internalizzazione di S1PRs, abbiamo voluto testare la sua capacità di indurre apoptosi nelle cellule LLC-B. A tale scopo, le cellule leucemiche sono state incubate con concentrazioni crescenti di MP07-66 (da 0 a 16 $\mu$ M) per 24 ore e sottoposte poi ad analisi al citofluorimetro. Come mostrato nella Figura 39A, l'apoptosi cellulare saliva al 50% alla concentrazione di MP07-66 16  $\mu$ M, questo evento è stato correlato al taglio di PARP ed è quindi indicativo di apoptosi caspasi-dipendente (Fig.39B). Considerando le proprietà mostrate da MP07-66, lo abbiamo quindi impiegato in associazione con l'inibitore di Lyn, dasatinib e valutato gli effetti nel tempo sulle cellule LLC-B. Se usati singolarmente, dasatinib (0.1  $\mu$ M) e MP07-66 (5  $\mu$ M) si sono rivelati scarsamente efficaci, la combinazione dei due ha invece mostrato un tasso di mortalità di circa il 70% già dopo 6 ore di trattamento (Fig.39C). Per confermare che l'induzione

del processo apoptotico fosse dovuta all'attivazione di PP2A, abbiamo quindi trattato le cellule con 5 nM AO. Alle 6 ore di incubazione, AO riduce drasticamente il tasso di apoptosi nelle cellule LLC-B trattate con dasatinib, MP07-66 o con entrambi (Fig.39D), supportando l'ipotesi che l'inibizione di PP2A sia centrale per la sopravvivenza delle cellule LLC-B.



**Figura 39. Effetto combinato (sinergismo) di dasatinib e MP07-66 sulla vitalità delle cellule LLC-B.** (A) Le cellule LLC-B isolate sono state trattate o meno con concentrazioni crescenti di MP07-66 per 24 ore ed è stata analizzata l'apoptosi mediante citofluorimetria a flusso. (B) Le cellule LLC-B trattate come sopra sono state lisate e analizzate mediante Wb con anticorpi anti-PARP e anti-β-actina come controllo di carico. (C) Le cellule sono state incubate o meno con 0.1 μM dasatinib e 5 μM MP07-66 per diverso tempo ed è stata analizzata l'apoptosi mediante citofluorimetria. (D) Le cellule isolate sono state trattate come descritto nel punto (C) in presenza o in assenza di acido okadaico (AO), alle 6 ore è stata monitorata l'apoptosi mediante citofluorimetria. I valori si riferiscono ad almeno tre esperimenti separati condotti in triplo su campioni provenienti da 20 pazienti LLC-B.

Abbiamo quindi lisato le cellule LLC-B trattate come descritto sopra e analizzato poi lo stato fosforilato dei substrati di PP2A, Akt, GSK-3β e SHP-1 e eseguito infine il saggio di attività fosfatase su pAkt. Anche in questo caso, il trattamento combinato di dasatinib e MP07-66 si è rivelato più efficace nell'indurre un calo nella fosforilazione dei substrati di PP2A rispetto ai singoli agenti (Fig.40A) e nel ripristinare l'attività fosfatase (Fig.40B); questi cui effetti sono stati quasi completamente contrastati dall'aggiunta di AO. Tali risultati indicano che nelle cellule LLC-B l'inibizione di PP2A può costituire un nuovo meccanismo di evasione dell'apoptosi sostenuto dall'attività aberrante di Lyn.



**Figura 40.** *Dasatinib e MP07-66 agiscono in modo sinergico nel ripristinare l'attività fosfatase di PP2A sui substrati endogeni ed esogeni.* (A) Le cellule sono state trattate o meno con 5 nM AO, in presenza o in assenza di 1  $\mu$ M dasatinib e/o 5  $\mu$ M MP07-66 per 6 ore. In seguito le cellule sono state lisate e analizzate mediante Wb con anticorpi anti p-Akt, Akt, anti-pGSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ , anti-pSer591SHP-1 e SHP-1. (B) Le cellule LLC-B isolate sono state incubate o meno con 1  $\mu$ M dasatinib e/o 5  $\mu$ M MP07-66 per 6 ore, poi lisate e sottoposte a saggio di attività fosfatase su pAkt ottenuto mediante immunoprecipitazione da campioni di LLC-B, in presenza o in assenza di 5 nM AO, per 10 minuti a 37°C. Dopo questo trattamento i campioni sono stati sottoposti ad analisi Wb con anticorpi anti-pAkt e anti-Akt. Gli istogrammi rappresentano la media  $\pm$  DS dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica delle bande Wb degli esperimenti condotti in triplo.

## 9 - Discussione

I risultati sopra descritti dimostrano che nelle cellule LLC-B, la forma citosolica aberrante di Lyn è responsabile della fosforilazione della subunità catalitica di PP2A (PP2Ac) in Tyr307, evento che stabilizza l'interazione di PP2A con il suo inibitore fisiologico SET. Ciò contribuisce in modo significativo al calo dell'attività della fosfatasi stessa e di conseguenza comporta la persistenza della fosforilazione Ser/Thr di substrati PP2A che mediano segnali anti-apoptotici e di sopravvivenza. Le evidenze sperimentali qui riportate avvalorano inoltre i dati ottenuti mediante l'approccio bioinformatico impiegato per l'identificazione di

caspasi 8 quale substrato di Lyn e identificano in PP2A un ulteriore bersaglio dell'anomala attività di Lyn nella LLC-B.

PP2A è un soppressore tumorale che regola i processi cellulari come il metabolismo, la crescita cellulare e la progressione del ciclo cellulare [Mumby, 2007; Chen et al., 1992, Seshacharyulu et al., 2013, Chen et al., 2013; Perrotti e Neviani, 2013]. L'attività di questa fosfatasi è finemente regolata, tale regolazione dipende dalla sua struttura eterotrimerica, dalle modificazioni post-traduzionali che avvengono in ogni singola subunità e dal legame con proteine interagenti [Sontag e Sontag, 2014]. Alterazioni in uno o più di questi meccanismi possono indurre l'inattivazione di PP2A, evento comune in molti tumori solidi e patologie ematopoietiche tra cui la LLC-B [Christensen et al., 2011; Saddoughi et al., 2013; Matloubian et al., 2004; Pippa et al., 2014]. In particolare, la sovra-espressione di SET costituisce un fattore ricorrente associato al malfunzionamento di PP2A e rappresenta un fattore prognostico negativo in queste patologie.

In tal senso, l'impiego di molecole che interferiscono con l'associazione PP2A/SET, quali l'analogo della sfingosina FTY720, gli analoghi da esso derivati, e gli antagonisti del peptide SET, si è rivelato promettente negli studi *in vitro* e su modelli animali in diversi tipi di neoplasie.

Inoltre, i nostri dati indicano l'esistenza di un altro meccanismo d'inibizione dell'attività fosfataseica nelle cellule LLC-B, esso è rappresentato dalla fosforilazione inibitoria della subunità catalitica di PP2Ac in Tyr307 da parte della tirosin-chinasi Lyn.

Abbiamo qui dimostrato come l'impiego degli inibitori di Lyn dasatinib, PP2 e saracatinib provoca un calo nel livello di fosforilazione in Tyr307 con conseguente attivazione dell'attività fosfataseica di PP2A, che a sua volta causa la defosforilazione dei substrati Akt, Gsk-3 $\beta$  e SHP-1 e infine blocca le vie di sopravvivenza. Effetti sovrapponibili sono stati osservati usando geldanamicina, un inibitore di Hsp90, il quale induce la dissociazione del complesso citosolico anomalo di Lyn, a conferma del fatto che la fosforilazione che causa l'inibizione di PP2A avviene per opera del *pool* citosolico iperattivo di Lyn. La fosforilazione in Tyr307 non induce soltanto l'inibizione di PP2A, ma rafforza ulteriormente il legame di PP2Ac con SET. Infatti, in seguito a trattamento con FTY720 il

complesso PP2A/SET si rivela più stabile nelle condizioni sperimentali in cui è preservata la fosforilazione tirosinica rispetto a quelle in cui ciò non avviene. Perciò, possiamo assumere l'esistenza di un complesso meccanismo non ancora identificato, mediante il quale pTyr307 rinforza l'inibizione di PP2A facilitando la formazione e stabilizzando il complesso PP2A/SET.

Allo scopo di sviluppare nuovi approcci terapeutici per il trattamento di LLC-B, sono stati sintetizzati nuovi analoghi di FTY720 non immunosoppressivi e testati per la loro capacità di antagonizzare SET e attivare PP2A. Sebbene FTY720 come tale sia capace di dissociare il complesso PP2A/SET, il suo impiego come farmaco antineoplastico è limitato a causa della sua azione immunosoppressiva dovuta alla trasformazione metabolica in un derivato fosforilabile, evento che causa internalizzazione dei recettori di S1P e alla fine *homing* dei linfociti [Matloubian et al., 2004]. Tra gli oltre 10 analoghi testati, un solo composto (MP07-66) si è dimostrato efficace nell'indurre l'apoptosi dei linfociti patologici. Questi dati sono in linea con studi recenti condotti in numerosi tumori che verificano l'effetto apoptotico anche per altri analoghi non fosforilabili di FTY720.

L'uso di MP07-66 in combinazione con dasatinib comporta l'amplificazione dell'apoptosi LLC-B in un modo sinergico, supportando l'ipotesi per cui due diversi eventi inibitori, quali la fosforilazione tirosinica e l'interazione con SET, convergono su di un unico bersaglio, PP2A, e cooperino strettamente al mantenimento del fenotipo maligno della LLC-B.

Studi recenti condotti sulla leucemia mieloide acuta e sulla leucemia mieloide cronica [Agarwal et al., 2014], riportano l'effetto sinergico degli inibitori tirosin-chinasici e degli antagonisti di SET, attribuendolo però al contributo indipendente dell'attività tirosin-chinasica anomala e dell'inibizione di PP2A mediata da SET. Nell'insieme, gli esperimenti qui riportati dimostrano il complesso meccanismo di regolazione di PP2A, fosfatasi coinvolta nel *cross-talk* continuo tra segnali fosfotirosinici e fosfoserinici/treoninici che preserva lo stato leucemico.

In conclusione, questo lavoro propone PP2A come nuovo potenziale bersaglio terapeutico nel trattamento delle LLC-B e conferma il ruolo chiave dell'attività citosolica aberrante di Lyn nel supportare i segnali oncogenici nell'ambito di tale

patologia. In futuro, l'impiego degli antagonisti di SET, quali gli analoghi di FTY720 privi degli effetti immunosoppressivi, in combinazione con gli inibitori SFK rappresenta una nuova strategia terapeutica per il trattamento della LLC-B.

## **BIBLIOGRAFIA**

Agarwal A, MacKenzie RJ, Pippa R, et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2014 Apr 15;20(8):2092-103.

Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Peter ME. Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002;14:721–726.

Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J., Mustelin T., Protein tyrosine phosphatases in the human genome. 2004 *Cell.* Jun 11;117(6):699-711.

Arnaud L, Chen S, Liu F, Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET, *FEBS Lett.* 2011 Sep 2;585(17):2653-9.

Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, Taylor AM, Fegan C, Moss P, Stankovic T. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood.* 2005 Nov 1;106(9):3175-82.

Awan H, Jønsson V, Johannesen TB, Ly B, Tjønnfjord GE. Anticipation in families with chronic lymphocytic leukemia and other lymphoproliferative disorders. *Transl Oncogenomics* 2010 Mar 30;4:1-9.

Barbero S, Mielgo A, Torres V, Teitz T, Shields DJ, Mikolon D, Bogyo M, Barila' D, Lahti YM, Schlaepfer D, Stupack DG. Caspase-8 Association with the Focal Adhesion Complex Promotes Tumor Cell Migration and Metastasis. *Cancer Res.* 2009 May 1; 69(9):3755-3763

Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*. 2003 Feb;11(2):529-41.

Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15(6):725-731.

Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 2004, 23: 7918-27.

Bröker LE, Kruyt FA F, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9): 3155-3162.

Brdicka T, Pavlistova D, Leo A, Bruyns E, Korinek V, Angelisova P, Scherer J, Shevchenko A, Hilgert I, Cerny J, Drbal K, Kuramitsu Y, Kornacker B, Horejsí V, Schraven B. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med*. 2000 May 1; 191:1591-1604.

Brunati AM, Deana R, Folda A, Massimino ML, Marin O, Ledro S, Pinna LA, Donella-Deana A. Thrombin-induced tyrosine phosphorylation of HS1 in human platelets is sequentially catalyzed by Syk and Lyn tyrosine kinases and associated with the cellular migration of the protein. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3;280(22):21029-35.

Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol*. 2013 Dec;34(12):592-601.

Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris- Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009;114(16):3367-3375.

Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, Coutre S, Tam CS, Mulligan SP, Jaeger U, Devereux S, Barr PM, Furman RR, Kipps TJ, Cymbalista F, Pocock C, Thornton P, Caligaris-Cappio F, Robak T, Delgado J, Schuster SJ, Montillo M, Schuh A, de Vos S, Gill D, Bloor A, Dearden C, Moreno C, Jones JJ, Chu AD, Fardis M, McGreivy J, Clow F, James DF, Hillmen P; RESONATE Investigators. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Jul 17;371(3):213-23.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brunati AM, Tibaldi E, Carraro A, Gringeri E, D'Amico F Jr, Toninello A, Massimino ML, Pagano MA, Nalesso G, Cillo U. Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FTY720 in activated HSC-cultures. *BiochimBiophysActa*. 2008 Mar;1783(3):347-59.

Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J ClinOncol*. 2008 Sep 20;26(27):4497-503.

Caplan AJ, Mandal AK, Theodoraki MA. Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol*. 2007 Feb;17(2):87-92.

Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*. 1992 Aug 28;257(5074):1261-4.

Chen W, Wang Z, Jiang C, Ding Y. PP2A-Mediated Anticancer Therapy. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:675429.

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Feb 24;352(8):804-15.

Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, Matta KM, Neil J, Davis ED, Volkheimer AD, Lanasa MC, Friedman DR, Goodman BK, Gockerman JP, Diehl LF, de Castro CM, Moore JO, Vitek MP, Weinberg JB. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4150-8.

Ciccione M, Ferrajoli A, Keating MJ, Calin GA. SnapShot: chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):770-770.

Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y. Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14361-9.

Cocco P, Satta G, Dubois S, Pili C, Pilleri M, Zucca M, 't Mannetje AM, Becker N, Benavente Y, de Sanjosé S, Foretova L, Staines S, Maynadié M, Nieters A, Brennan P, Miligi L, Ennas MG, Boffetta P. Lymphoma risk and occupational exposure to pesticides: results of the Epilymph study. *Occup Environ Med*. 2013 Feb; 70(2):91-8

Contri A, Brunati AM, Trentin L, Cabrelle A, Miorin M, Cesaro L, Pinna LA, Zambello R, Semenzato G, Donella-Deana A. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):369-78.

Cursi S, Rufini A, Stagni V, Condò I, Matafora V, Bachi A, Bonifazi AP, Coppola L, Superti-Furga G, Testi R, Barilà D. Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J*. 2006 May 3;25(9):1895-905.

Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:69-94.

Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):4087-93.

de Weerd I, Eldering E, van Oers MH, Kater AP. The biological rationale and clinical efficacy of inhibition of signaling kinases in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2013 Jul;37(7):838-47.

Donella-Deana A, James P, Staudenmann W, Cesaro L, Marin O, Brunati AM, Ruzzene M, Pinna LA. Isolation from spleen of a 57-kDa protein substrate of the tyrosine kinase Lyn. Identification as a protein related to protein disulfide-isomerase and localization of the phosphorylation sites. *Eur J Biochem.* 1996;235((1-2):18-25.

Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grütter MG. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell.* 2003;11(2): 543-549.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001;411:342–348.

Fernández JJ, Candenás ML, Souto ML, Trujillo MM, Norte M. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem.* 2002 Jan;9(2):229-62.

Finlay D, Howes A, Vuori K. Critical role for caspase-8 in epidermal growth factor signaling. *Cancer Res.* 2009;69(12):5023-5029.

Finlay D, Vuori K. Novel noncatalytic role for caspase-8 in promoting SRC-mediated adhesion and Erk signaling in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2007 Dec 15;67(24):11704-11.

Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Teramo A, Carraro S, Cabrelle A, Facco M, Zambello R, Tibaldi E, Brunati AM, Semenzato G, Trentin L. HS1, a Lyn kinase substrate, is abnormally expressed in B-chronic lymphocytic leukemia and correlates with response to fludarabine-based regimen. *PLoS One.* 2012;7(6):e39902.

Frish SM. Caspase-8: fly or die. *Cancer Res.* 2008;68(12):4491-4493.

Fulda S. Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett.* 2009;281(2):128-133.

Futami M, Zhu QS, Whichard ZL, Xia L, Ke Y, Neel BG, Feng GS, Corey SJ. G-CSF receptor activation of the Src kinase Lyn is mediated by Gab2 recruitment of the Shp2 phosphatase. *Blood.* 2011 Jul 28;118(4):1077-86

Gamliel A, Afri M, Frimer AA. Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps. *Free radical biology and medicine.* 2008; (44):1394-1405.

Giannini A, Bijlmarkers M.J. Regulation of the Src family kinase Lck by Hsp90 and ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 2004;(24): 5667-5676.

Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, Ruffing N, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol.* 2002 May;32(5):1403-13.

Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A., and Barford, D. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*. 1999;96:99–110.

Guo F, Stanevich V, Woldarchak N, Sengupta R, Jiang L, Satyshur KA, Xing Y. Structural basis of PP2A activation by PTPA, an ATP-dependent activation chaperone. *Cell Research*. 2014;24:190-203.

Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:138-50.

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456.

Hamblin, T.J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. 2007; 20: 455-468.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6): 1848-1854.

Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):1023-9.

Hao JJ, Carey GB, Zhan X. Syk-mediated Tyrosine Phosphorylation Is Required for the Association of Hematopoietic Lineage Cell-specific Protein 1 with Lipid Rafts and B Cell Antigen Receptor Signaling Complex. *J Biol Chem.* 2004;279:33413-33420

Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, Gibellini F, Njuguna N, Lee E, Stennett L, Raghavachari N, Liu P, McCoy JP, Raffeld M, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Sherry R, Arthur DC, Maric I, White T, Marti GE, Munson P, Whilson WH, Wiestner A. The lymphnode microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011 Jan 13; 117(2):563-74.

Hibbs ML, Harder KW, Armes J, Kountouri N, Quilici C, Casagrande F, Dunn AR, Tarlinton DM. Sustained activation of Lyn tyrosine kinase in vivo leads to autoimmunity. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1593-604.

Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res.* 2012;40

Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ, Ramachandran C. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):843-51.

Ingley E. Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease. *Cell Commun Signal.* 2012 Jul 17; 10(1):21.

Ikeda K, Nakayama Y, Ishii M, Obata Y, Kasahara K, Fukumoto Y, Yamaguchi N. Requirement of the SH4 and tyrosine-kinase domains but not the kinase activity

of Lyn for its biosynthetic targeting to caveolin-positive Golgi membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;(1790):1345-1352.

Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. 2001; 353:417-439.

Janssens V, Rebollo A. The role and therapeutic potential of Ser/Thr phosphatase PP2A in apoptotic signaling networks in human cancer cells. *Curr Mol Med*. 2012;):248-56.

Jia SH, Parodo J, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. Dynamic regulation of neutrophil survival through tyrosine phosphorylation or dephosphorylation of caspase-8. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5402-13.

Jin YJ, Yu CL, Burakoff SJ. Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity. *J. Biol. Chem*. 1999;274:28301-28307.

Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(4):558-563.

Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, et al. Quantitative characterization and potential function of membrane Fas/APO-1 (CD95) receptors on leukaemic cells from chronic B and T lymphoid leukaemias. *Br J Haematol*. 1997;99(4): 858-865.

Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, Shimonishi Y, Nada S, Nagai K, Tarakhovsky A, Okada M. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature*. 2000 Apr 27;404(6781):999-1003.

Keller N, Grütter MG, Zerbe O. Studies of the molecular mechanism of caspase-8 activation by solution NMR. *Cell Death Differ*. 2010 Apr;17(4):710-8.

Kim HS, Lee JW, Soung YH, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Jeong SW, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology*. 2003; 125:708-715.

Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, Sivina M, Wierda WG, Estrov Z, Keating MJ, Shehata M, Jäger U, Gandhi V, Kay NE, Plunkett W, Burger JA. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. 2009 Nov 12;114(20):4441-50.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998 Apr 1;91(7):2387-96.

Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*. 2005 Aug 4;24(33):5137-48. Review.

Le Guelte A., Galan-Moya E.M., Dwyer J., Treps L., Kettler G., Hebda J.K., Dubois S., Auffray C., Chneiweiss H., Bidere N. e Gavard J. Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. *J of Cell Science* 2012;125:4137-4146.

Leverrier S, Salvesen GS, Walsh CM. Enzymatically active single chain caspase-8 maintains T-cell survival during clonal expansion. *Cell Death Differ*. 2011;18(1):90-98.

Lin K, Rockliffe N, Johnson GG, Sherrington PD, Pettitt AR. Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2008 Apr 10; 27(17):2445-55.

Linnet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, Richardon DB, Landgren O, Blair A, Silver S, Field RW, Caldwell G, Hatch M, Dores GM. Chronic lymphocytic leukemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol*. 2007 Dec; 139(5):672-86

MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJ, Barnett GA, Pringle JH, Cohen GM. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 2002 Oct 3;21(44):6809-18.

Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, Van der Bruggen P. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.* 1997; (186):785–793.

Manning G, White DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298: 1912-1934.

Masuzawa Y, Kudou T, Maizuru Y, Fumiyo S, Tanima D, Yano T, Mine K. Preparation of haloalkylsulfonamide derivatives as herbicides. WO 2008102908 A1, Aug 28 2008.

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004 Jan 22;427(6972):355-60.

McCaig AM, Cosimo E, Leach MT, Michie AM. Dasatinib inhibits CXCR4 signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells and impairs migration towards CXCL12. *PLoS One*. 2012;7(11):e48929.

Medina M Avila J, Villaneuva N. Use of okadaic acid to identify relevant phosphopeptides in pathology: a focus on neurodegeneration. *Mar Drugs*. 2013 May 21;11(5):1656-68.

Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):755-64.

Miller MA, Karacay B, Zhu X, O'Dorisio MS, Sandler AD. Caspase 8L a novel inhibitory isoform of caspase 8 is associated with undifferentiated neuroblastoma, Apoptosis. 2006; 11:15–24.

Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer*. 2010 Jun 11;9:144.

Misra RS, Russell JQ, Koenig A, Hinshaw-Makepeace JA, Wen R, Wang D, Huo H, Littman DR, Ferch U, Ruland J, Thome M, Budd RC. Caspase-8 and c-FLIPL associate in lipid rafts with NF-kappaB adaptors during T cell activation. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):19365-74.

Mohr A, Zwacka RM, Jarmy G, Buneker C, Schrezenmeier H, Dohner K, Beltinger C, Wiesneth M, Debatin KM, Stahnke K. Caspase-8L expression protects CD34+ hematopoietic progenitor cells and leukemic cells from CD95-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2005; 24:2421–2429.

Mumby M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):21-4.

Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):1012-20.

Nuñez G., Benedict M. A., Hu Y., Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998;17: 3237-3245.

Omar HA, Chou CC, Berman-Booty LD, Ma Y, Hung JH, Wang D, Kogure T, Patel T, Terracciano L, Muthusamy N, Byrd JC, Kulp SK, Chen CS. Antitumor effects of OSU-2S, a nonimmunosuppressive analogue of FTY720, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011 Jun;53(6):1943-58.

Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol*. 2003 Aug 19;13(16):1356-64.

Pearl LH, Prodromou C, Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J*. 2008 Mar 15; 410(3):439-53.

Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Jan 26;366(4):339-47.

Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):e229-38.

Pippa R, Dominguez A, Christensen DJ, Moreno-Miralles I, Blanco-Prieto MJ, Vitek MP, Odero MD. Effect of FTY720 on the SET-PP2A complex in acute

myeloid leukemia; SET binding drugs have antagonistic activity. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1915-8.

Pitman MR, Woodcock JM, Lopez AF, Pitson SM. Molecular targets of FTY720 (fingolimod). *CurrMol Med*. 2012 Dec;12(10):1207-19.

Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (engl)*. 2004 Jul;13(3):279-87.

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*.1975;46:219–234.

Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochi Biophys Acta* 1999, 1451:1-16.

Riley JS, Hutchinson R, McArt DG, Crawford N, Holohan C, Paul I, Van Schaeybroeck S, Salto-Tellez M, Johnston PG, Fennell DA, Gately K, O'Byrne K, Cummins R, Kay E, Hamilton P, Stasik I, Longley DB. *Cell Death Dis*. 2013 Dec 5; 4:e951.

Roberts KG, Smith AM, McDougall F, Carpenter H, Horan M, Neviani P, Powell JA, Thomas D, Guthridge MA, Perrotti D, Sim AT, Ashman LK, Verrills NM. Essential requirements for PP2A inhibition by the oncogenic receptor c-KIT suggests PP2A reactivation as a strategy to treat c-KIT+ cancers. *Cancer Res*. 2010 Jul 1;70(13):5438-47.

Romano C, De Fanis U, Sellitto A, Chiurazzi F, Guastafierro S, Giunta R, Tirelli A, Rotoli B, Lucivero G. Induction of CD95 upregulation does not render chronic lymphocytic leukemia B-cells susceptible to CD95-mediated apoptosis. *Immunol Lett*. 2005 Feb 15;97(1):131-9.

Rosati E, Sabatini R, Rampino G, De Falco F, Di Ianni M, Falzetti F, Fettucciari K, Bartoli A, Screpanti I, Marconi P. Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2713-23.

Rossi D, Ciardullo C, Spina V, Gaidano G. Molecular bases of chronic lymphocytic leukemia in light of new treatments. *Immunol Lett*. 2013 Sep-Oct;155(1-2):51-5.

Roskoski RJ. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. 2005 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 331: 1-14.

Rothschild SI, Gautschi O, Haura EB, Johnson FM. Src inhibitors in lung cancer: current status and future directions. *Clin Lung Cancer*. 2010 Jul 1;11(4):238-42.

Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, Ward KE, Mukhopadhyay A, Oaks J, Bielawski J, Szulc ZM, Thomas RJ, Selvam SP, Senkal CE, Garrett-Mayer E, De Palma RM, Fedarovich D, Liu A, Habib AA, Stahelin RV, Perrotti D, Ogretmen B. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med*. 2013 Jan;5(1):105-21.

Scielzo C, Ghia P, Conti A, Bachi A, Guida G, Geuna M, Alessio M, Caligaris-Cappio F. Hs1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patients subsets with good or poor prognoses. *J Clin Invest*. 2005 Jun;115(6):1644-50.

Senft J, Helfer B, Frisch SM. Caspase-8 interacts with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11505-9.

Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett.* 2013 Jul 10;335(1):9-18.

Shi Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell.* 2009; 139(3):468-484.

Slupe AM, Merrill R, Strack S. Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res.* 2011;2011:398751.

Sohn D, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis. *J. of Biological Chemistry.* 2005;280:5267-5273.

Somani AK, Yuen K, Xu F, Zhang J, Branch DR, Siminovitch KA. The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:1938-1944.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar;9(1):59-71.

Soulsby M e Bennett AM. Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases. *Physiology (Bethesda).* 2009 Oct;24:281-9.

Soung YH, Lee JW, Kim SY, Jang J, Park YG, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas, *Cancer Res.* 2005;65:815–821.

Stevenson FK, Sergey K, Davies AjJ, Packam G B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011 Oct 20;(118):16.

Stupack DG. Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. *Cancer Letters*. 2013;332:133-140.

Sun G, Ramdas L, Wang W, Vinci J, McMurray J, Budde RJ. Effect of autophosphorylation on the catalytic and regulatory properties of protein tyrosine kinase Src. *Arch Biochem Biophys*. 2002; 397:11-17.

Swingle M, Ni L, Honkanen RE. Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol Biol*. 2007;365:23-38.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYC. *Nat. Med*. 2000;6:529-535.

Tatosyan AG, Mizenina OA. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2000 Jan;65(1):49-58.

ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *PharmacolTher*. 2014 Dec;144(3):338-348.

ten Hacken E, Scielzo C, Bertilaccio MT, Scarfò L, Apollonio B, Barboglio F, Stamatopoulos K, Ponzoni M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Targeting the LYN/HS1 axis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013 Mar 2;121(12):2264-73.

Thompson JE, Thompson CB. Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol*. 2004 Oct 15;22(20):4217-26.

Tibaldi E, Brunati AM, Zonta F, Frezzato F, Gattazzo C, Zambello R, Gringeri E, Semenzato G, Pagano MA, Trentin L. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2011 Nov;25(11):1768-81.

Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, Davi F, Cassuto JP, Deckert M, Bernard A. Homeostatic chemokines increase survival of B- chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*.2007;26(50):7081-91.

Trentin L, Frasson M, Donella-Deana A, Frezzato F, Pagano MA, Tibaldi E, Gattazzo C, Zambello R, Semenzato G, Brunati AM. Geldanamycin-induced Lyn dissociation from aberrant Hsp90-stabilized cytosolic complex is an early event in apoptotic mechanisms in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4665-74.

Troeger A, Johnson AJ, Wood J, Blum WG, Andritsos LA, Byrd JC, Williams DA. RhoH is critical for cell-microenvironment interactions in chronic lymphocytic leukemia in mice and humans. *Blood*. 2012 May 17;119(20):4708-18.

Vaisitti T, Audrito V, Serra S, Buonincontri R, Sociali G, Mannino E, Pagnani A, Zucchetto A, Tissino E, Vital C, Coscia M, Usai C, Pepper C, Gattei V, Bruzzone S, Deaglio S. The enzymatic activities of CD38 enhance CLL growth and trafficking: implications for therapeutic targeting. *Leukemia*. 2014 Jul 3.

Van Noesel MM, Van Bezouw S, Voute PA, Herman JG, Pieters R, Versteeg R. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;38:226–233.

van Raam BJ, Salvesen GS. Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):113-22.

Varfolomeev EE, Schumann M, Luria V, Chaiyasilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998 Aug; 9(2):267-76.

Wang D, Esselman WJ, Cole PA. Substrate conformational restriction and CD45-catalysed dephosphorylation of tail tyrosine-phosphorylated Src protein. *J Biol Chem*. 2002, 277:40428-40433.

Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008 Apr;14(4):152-60.

Whiting RJ, Payne CJ, Satiaputra J, Kucera N, Qiu TW, Irtegun S, Gunn NJ, Slavova-Azmanova NS, Mulhern TD, Ingley E. Targeting Lyn tyrosine kinase through protein fusions encompassing motifs of Cbp (Csk-binding protein) and the SOCS box of SOCS1. *Biochem J*. 2012 Mar 15;442(3):611-20.

Williams NK, Lucet IS, Klinken SP, Ingley E, Rossjohn J. Crystal structure of the Lyn protein tyrosine kinase domain in its Apo- and inhibitor-bound state. *J Biol Chem*. 2009; 284:284-291.

Xing, Y., Xu, Y., Chen, Y., Jeffrey, P.D., Chao, Y., Lin, Z., Li, Z., Strack, S., Stock, J.B., and Shi, Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*. 2006;127:341–353.

Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*. 1999;3:629-628.

Yang SM, Li JY, Gale RP, Huang XJ. The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? *Blood Rev*. 2014 Dec 13.

Yao Z, Duan S, Hou D, Heese K, Wu M. Death effector domain DEDa, a self-cleaved product of caspase-8/Mch5, translocates to the nucleus by binding to ERK1/2 and upregulates procaspase-8 expression via a p53-dependent mechanism. *The EMBO Journal*. 2007;26: 1068-1080.

Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Mar;33(3):122-8.

Zhang S, Kipps TJ. The Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2014; 9:103-118.

Zhao Y, Sui X, Ren H. From procaspase-8 to caspase-8: revisiting structural functions of caspase-8. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):316-320.

Zolnierowicz S. Type 2A Protein Phosphatase, the Complex Regulator of Numerous Signaling Pathways. *Biochem Pharmacol*. 2000 Oct 15;60(8):1225-35.

## APPENDICE

### ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI:

Frezzato F, Trimarco V, Martini V, Gattazzo C, Ave E, Visentin A, Cabrelle A, Olivieri V, Zambello R, Facco M, **Zonta F**, Cristiani A, Brunati AM, Moro S, Semenzato G, Trentin L. Leukaemic cells from chronic lymphocytic leukaemia patients undergo apoptosis following microtubule depolymerization and Lyn inhibition by nocodazole. *Br J Haematol*. 2014 Jun;165(5):659-72.

Gattazzo C, Martini V, Frezzato F, Trimarco V, Tibaldi E, Castelli M, Facco M, **Zonta F**, Brunati AM, Zambello R, Semenzato G, Trentin L. Cortactin, another player in the Lyn signaling pathway, is over-expressed and alternatively spliced in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014 Jun;99(6):1069-77.

**Zonta F**, Pagano MA, Trentin L, Tibaldi E, Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Mazzorana M, Bordin L, Semenzato G, Brunati AM. Lyn-mediated procaspase 8 dimerization blocks apoptotic signaling in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Feb 6;123(6):875-83.

Tibaldi E, **Zonta F**, Bordin L, Magrin E, Gringeri E, Cillo U, Idotta G, Pagano MA, Brunati AM. The tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits proliferation of activated hepatic stellate cells by impairing PDGF receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb;1843(2):288-98.

Battaglia V, Tibaldi E, Grancara S, **Zonta F**, Brunati AM, Martinis P, Bragadin M, Grillo MA, Tempera G, Agostinelli E, Toninello A. Effect of peroxides on spermine transport in rat brain and liver mitochondria. *Amino Acids*. 2012 Feb;42(2-3):741-9.

Tibaldi E, Venerando A, **Zonta F**, Bidoia C, Magrin E, Marin O, Toninello A, Bordin L, Martini V, Pagano MA, Brunati AM. Interaction between the SH3 domain of Src family kinases and the proline-rich motif of HTLV-1 p13: a novel mechanism underlying delivery of Src family kinases to mitochondria. *Biochem J*. 2011 Nov 1;439(3):505-16.

Tibaldi E, Brunati AM, **Zonta F**, Frezzato F, Gattazzo C, Zambello R, Gringeri E, Semenzato G, Pagano MA, Trentin L. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2011 Nov;25(11):1768-81.

## ABSTRACT PUBBLICATI:

**Zonta F**, Pagano M A, Tibaldi E, Trentin L, Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Semenzato G, Brunati A M. Phosphorylation of PP2A by Lyn is a key phenomenon in the cancer phenotype of B-CLL. Abstract Book XIII Congress of the Italian Society of Experimental Hematology, Rimini, Italy, October 15-17, 2014. *Haematologica*. 2014 Oct; 99(s2):S71.

**Zonta F**, Pagano MA, Trentin L, Tibaldi E, Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Mazzorana M, Bordin L, Semenzato G, Brunati AM. Lyn-mediated procaspase 8 dimerization blocks apoptotic signaling in B-cell chronic lymphocytic leukemia.. *Abstract Book XV iwCLL, Cologne, Germany, September 9-11, 2013*.

Tibaldi E, Venerando A, **Zonta F**, Bidoia C, Magrin E, Marin O, Toninello A, Bordin L, Pagano MA, Brunati AM. Interaction between SH3 domain of Src family kinases and HTLV-1 p13's proline rich motif confers novel functional properties to the single components. *FEBS J*. 2011;278(S1):386-87.

Trentin L, Gattazzo C, Martini V, Frezzato F, Trimarco V, Cabrelle A, Olivieri V, **Zonta F**, Tibaldi E, Brunati A M, Zambello R, Semenzato G. Cortactin Is Overexpressed In Neoplastic Cells of Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2010 Nov;116: 2436.

## LAVORI SOTTOMESSI A RIVISTE:

**Zonta F**, Pagano M A, Tibaldi E, Trentin L, Zagotto G, Frezzato F, Trimarco V, Pavan V, Semenzato G, Brunati A M. Lyn sustains oncogenic signaling in B chronic lymphocytic leukemia by strengthening SET-mediated inhibition of PP2A. Under revision - *Blood*.

Grancara S, **Zonta F**, Ohkubo S, Brunati AM, Agostinelli E, Toninello A. Pathophysiological implications of mitochondrial oxidative stress mediated by mitochondriotropic agents and polyamines, role of tyrosine phosphorylation. Review under revision - *Amino Acids*.