

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche



DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE MEDICHE - CICLO XXVI  
Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTITUMORALE  
DELL'INIBITORE DEGLI HDAC ITF2357 (GIVINOSTAT®) IN  
MODELLI PRECLINICI DI LINFOMA NON-HODGKIN A  
CELLULE B C-MYC POSITIVI**

Settore BIO/13 – Biologia Applicata

DOTTORANDO

Dott.ssa Alessandra Cavanè

Matr. R09352

RELATORE

Prof. Carmelo Carlo-Stella

CORRELATORE

Dott. Massimo Di Nicola

COORDINATORE DEL CORSO DI DOTTORATO

Prof. Alessandro Gianni

Anno Accademico 2012/2013

*“Nature was not designed to make life easy for biologists.”*

*Colin Tudge.*

# INDICE

<b>ABBREVIAZIONI</b>	<b>5</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>9</b>
1. 1 IL FATTORE TRASCRIZIONALE C-MYC	10
1.1.1 STRUTTURA DI C-MYC	10
1.1.2 ATTIVITA' BIOLOGICA DI C-MYC	12
1.1.2.1 <i>Proliferaazione e metabolismo cellulare</i>	12
1.1.2.2 <i>Apoptosi</i>	14
1.1.2.3 <i>Modulazione di micro RNA</i>	17
1.1.3 C-MYC E ONCOGENESI	20
1.2 LINFOMI NON HODGKIN A CELLULE B C-MYC+	22
1.2.1 EZIOPATOGENESI DEI B-NHL	22
1.2.2 CARATTERISTICHE DEI LINFOMI B-NHL C-MYC POSITIVI	24
1.2.2.1 <i>Linfoma di Burkitt</i>	24
1.2.2.2 <i>Linfoma diffuso a grandi cellule</i>	26
1.2.2.3 <i>Altre tipologie di linfomi</i>	27
1.3 HDAC INIBITORI COME AGENTI ANTI-NEOPLASTICI	29
1.3.1 CLASSIFICAZIONE E RUOLO BIOLOGICO DEGLI HDAC	30
1.3.2 HDAC COME BERSAGLI DI TERAPIA NELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE	34
1.3.3 CLASSIFICAZIONE E UTILIZZO CLINICO DEGLI HDAC INIBITORI NEL TRATTAMENTO DEI NHL	36
1.3.4 MECCANISMO D'AZIONE DEGLI HDAC INIBITORI	37
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>44</b>
3.1 FARMACI	45
3.2 LINEE CELLULARI E CONDIZIONI DI COLTURA	45
3.3 ANALISI CITOFLUORIMETRICHE	45
3.3.1 <i>Valutazione citofluorimetrica dell'espressione di c-Myc</i>	45
3.3.2 <i>Valutazione della quota di apoptosi</i>	46
3.3.3 <i>Analisi della perturbazione del ciclo cellulare</i>	47
3.4 REAL-TIME PCR	48
3.5 ANALISI WESTERN BLOT	48

3.5.1	<i>Estrazione delle proteine totali</i>	48
3.5.2	<i>Estrazione delle proteine istoniche</i>	48
3.5.3	<i>Quantificazione degli estratti proteici</i>	49
3.5.4	<i>Elettroforesi e marcatura con anticorpi</i>	49
3.6	MODELLO SPERIMENTALE IN VIVO	51
3.6.1	<i>Xenotrapianto e trattamento di tumori linfoidi umani in topi SCID</i>	51
3.6.2	<i>Processamento dei noduli tumorali</i>	51
3.7	ANALISI STATISTICHE	52
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>53</b>
4.1	ATTIVITA' ANTI-TUMORALE DI ITF2357 IN VITRO	54
4.1.2	<i>Inibizione della proliferazione cellulare in seguito a trattamento con ITF2357</i>	54
4.1.3	<i>Effetti citostatici/citotossici associati all'attività di ITF2357</i>	56
4.2	CARATTERIZZAZIONE DEL MECCANISMO D'AZIONE DI ITF2357 IN VITRO	59
4.2.1	<i>Modulazione dei livelli di acetilazione dei principali target degli HDAC</i>	59
4.2.2	<i>Alterazione delle principali molecole citostatiche e pro-apoptotiche</i>	60
4.2.3	<i>Modulazione dei livelli proteici di c-Myc</i>	62
4.2.4	<i>ITF2357 interferisce a livello post-trascrizionale sulla regolazione dell'espressione di c-Myc</i>	64
4.3	ATTIVITA' ANTI-LINFOMA DI ITF2357 IN VIVO	70
4.3.1	<i>Attività terapeutica</i>	70
4.3.2	<i>Meccanismo d'azione</i>	72
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>
	<b>TABELLE SUPPLEMENTARI</b>	<b>86</b>

## ABBREVIAZIONI

AID	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>
APAF-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia related</i>
BAX	<i>BCL2 associated protein X</i>
BAK	<i>BCL2 antagonist killer 1</i>
BL	<i>Burkitt's lymphoma</i>
BCL6	<i>B-cell lymphoma protein 6</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CTX	<i>Cyclophosphamide</i>
DLBCL	<i>Diffuse large B cell lymphoma</i>
DNMT	<i>DNA methyl transferase</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
eIF-4E	<i>Eucaryotic translation initiation factor-4E</i>
eIF-4G	<i>Eucaryotic translation initiation factor-4G</i>
4E-BP-1	<i>Elongation-initiation factor 4E-binding protein</i>
ERK	<i>Extracellular Related Kinase</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FL	<i>Follicular lymphoma</i>
GC	<i>Germinal center</i>
GSK- $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase- <math>\beta</math></i>
HAT	<i>Histone acetyl transferase</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor-1 <math>\alpha</math></i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
MCL	<i>Mantle cell lymphoma</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NHL	<i>Non-Hodgkin lymphoma</i>
NHL-B	<i>B-cell Non-Hodgkin lymphoma</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	<i>Phosphoinositol-3-kinase</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficient</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>

TNF

*Tumor necrosis factor*

VEGF

*Vascular endothelial growth factor*

## RIASSUNTO

Il fattore trascrizionale c-Myc gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi e nella progressione dei linfomi non-Hodgkin a cellule B (B-NHL) e la sua deregolazione è generalmente associata ad una cattiva prognosi<sup>1-8</sup>. L'attivazione aberrante della proteina c-Myc può essere causata da anomalie cromosomiche, come traslocazioni o mutazioni, oppure da modifiche post-traduzionali che ne determinano l'iperespressione<sup>1,3</sup>. Osservazioni recenti indicano che c-Myc è in grado non solo di attivare e reprimere rispettivamente molti oncogeni e oncosoppressori, ma anche di modificare il profilo di espressione di alcuni microRNA<sup>9</sup>, stabilendo così un secondo livello di controllo sull'espressione genica ai fini del mantenimento del fenotipo neoplastico.

Date le molteplici evidenze a sostegno della capacità di c-Myc di promuovere il suo programma trascrizionale interagendo con regolatori epigenetici, come gli enzimi istone-deacetilasi (HDAC)<sup>10-12</sup>, i farmaci che inibiscono gli HDAC potrebbero essere utilizzati in clinica revertendo il fenotipo neoplastico indotto dall'iperespressione di c-Myc. Pertanto, in questo progetto sono stati analizzati gli effetti antitumorali indotti da un farmaco pan-inibitore degli HDAC, ITF2357 (Givinostat ®), in modelli preclinici di NHL di tipo B che esprimono ad alti livelli la proteina c-Myc.

I risultati ottenuti dimostrano che ITF2357 è in grado di ridurre significativamente la crescita *in vitro* di cellule di NHL a cellule B, provocando un arresto del ciclo cellulare in fase G1, accompagnato da un progressivo aumento di apoptosi cellulare. Questi effetti sono correlati alla down-modulazione dei livelli proteici di c-Myc e associati all'induzione di due microRNA che bloccano la sintesi proteica di c-Myc, Let-7a e miR-26a. Dal momento che l'aumento della trascrizione dei microRNA non risulta essere persistente nel tempo e non giustifica pienamente la repressione di c-Myc, sono stati analizzati i livelli di attivazione della traduzione cap-dipendente che regola la sintesi di molte oncoproteine, tra cui anche c-Myc. Il trattamento con ITF2357 inibisce le principali molecole coinvolte nella traduzione cap-dipendente (4E-BP-1, eIF-4E, eIF-4G) e i due maggiori regolatori (PIM e Akt) in funzione della sensibilità cellulare all'attività antitumorale dell'HDAC inibitore. Inoltre, il trattamento farmacologico con ITF2357 riduce in modo significativo la crescita *in vivo* di due modelli cellulari di linfoma di Burkitt, ed in combinazione con ciclofosfamida a dosi sub-ottimali genera delle remissioni complete dalla malattia nella maggior parte degli animali, al pari o in alcuni casi maggiori rispetto al trattamento con ciclofosfamida a dosi ottimali.

Complessivamente, i risultati ottenuti indicano che ITF2357 esercita una spiccata attività antitumorale in linfomi non-Hodgkin a cellule B c-Myc positivi, i quali sono generalmente associati ad una cattiva prognosi. La somministrazione di ITF2357, come singolo agente o in associazione alla chemioterapia convenzionale, potrebbe sia aumentare il tasso di risposte cliniche che ridurre le dosi di chemioterapici limitandone gli effetti collaterali.

# INTRODUZIONE

## 1.1 IL FATTORE TRASCRIZIONALE C-MYC

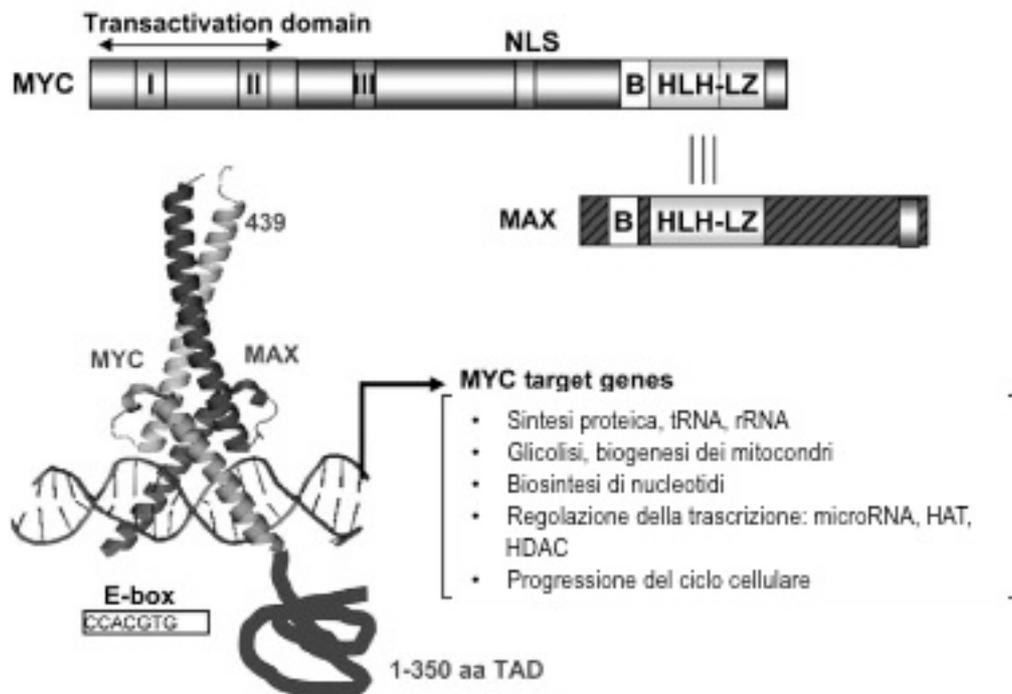
### 1.1.2 STRUTTURA E FUNZIONE DI C-MYC

C-Myc appartiene ad una famiglia di geni che includono anche N-Myc, L-Myc e B-Myc. Le proteine per cui codificano questi geni dirigono le funzioni cellulari che sono correlate alla crescita, alla progressione del ciclo cellulare, alla sopravvivenza ed alla biosintesi<sup>13,14</sup>. Il dominio N-terminale di c-Myc contiene tre sequenze altamente conservate chiamate *MYC-boxes* (MB) I, II, III che risultano essenziali per la stabilità della proteina, per le interazioni con altre molecole proteiche e per l'attivazione o la repressione trascrizionale dei geni target<sup>13,14</sup>. Il dominio C-terminale, invece, è costituito da un motivo *helix-loop-helix-leucine zipper* (HLH-ZL) che media la dimerizzazione omotipica o eterotipica con altre proteine che possiedono lo stesso motivo<sup>13,14</sup>. C-Myc è in grado di attivare trascrizionalmente una varietà di geni target formando un complesso eterodimerico con la proteina MAX (figura 1.1). L'interazione con MAX avviene attraverso il dominio HLH-LZ e permette alle regioni ricche di amminoacidi basici adiacenti alle regioni HLH-LZ delle due proteine di interagire con le *E-boxes* del DNA (5'-CA(C/T)GTG-3')<sup>15,16</sup>. Le regioni *E-Boxes* sono sequenze esanucleotidiche specifiche che costituiscono il sito di riconoscimento di c-Myc e sono presenti sulle regioni promotrici dei geni responsivi di c-Myc. All'estremità N-terminale di c-Myc è anche presente un dominio denominato TAD o "dominio di transattivazione", che costituisce la zona d'interazione tra c-Myc e proteine necessarie al rimodellamento della cromatina come gli HAT o proteine del complesso SWI/SNF<sup>13,14</sup>. Questo permette quindi alla proteina c-Myc di agire a livello epigenetico sull'espressione dei suoi geni target. In particolare, l'interazione con gli enzimi acetil-transferasi (HAT) p300 e CBP è diretto<sup>13,14</sup>, mentre il legame con gli enzimi TIP60 o GCN5 richiede una proteina adattatrice, TRRAP. Altri meccanismi attraverso cui c-Myc modula l'espressione genica coinvolgono il legame con il fattore di allungamento P-TEFb, che gioca un ruolo fondamentale nel reclutamento della RNA polimerasi II, o l'enzima ubiquitina ligasi SKP2, che funziona da coattivatore<sup>17-19</sup>. La proteina MAX è presente in eccesso stechiometrico rispetto a c-Myc e spesso forma omodimeri che possono competere con c-Myc per il legame sulle sequenze *E-boxes*. In aggiunta, MAX può formare dimeri anche con le proteine Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4, Mnt che, a loro volta, possono legare le *E-boxes* e reprimere la trascrizione genica attraverso il reclutamento di complessi proteici che includono gli HDAC<sup>14</sup>.

C-Myc è stato da sempre considerato un attivatore trascrizionale che agisce attraverso il rimodellamento della cromatina, in realtà, esistono meccanismi diretti o indiretti, attraverso cui c-Myc può anche reprimere la trascrizione genica. Il primo esempio di repressione trascrizionale indiretta è rappresentato dall'inibizione della trascrizione del gene CDKN1A che codifica per la proteina p21 (inibitore delle CDK che agisce a livelli del checkpoint G1/S). L'attivazione trascrizionale del gene CDKN1A è fisiologicamente

mediata dal fattore trascrizionale MIZ-1. Gli eterodimeri c-Myc/MAX sono in grado di impedire l'interazione di MIZ-1 con l'enzima HAT p300 e reclutare la DNMT3a per indurre il silenziamento al livello delle regioni promotrici del gene target di MIZ-1<sup>20</sup>. Inoltre, la proteina c-Myc può reprimere la trascrizione reclutando complessi che rimodellano la cromatina tra cui gli HDAC<sup>10</sup>. In particolare, il reclutamento degli enzimi HDAC è mediato dalla regione MBIII e provoca la condensazione della cromatina ed il conseguente silenziamento dei geni target<sup>10</sup>.

Il fattore trascrizionale c-Myc regola circa il 15% dei geni cellulari coinvolti nelle più importanti attività biologiche della cellula. Pertanto, non sorprende che la sua deregolazione sia spesso associata al processo di tumorigenesi e che la sua iperespressione sia stata rinvenuta nel 30% dei tumori umani<sup>3</sup>.



**Fig.1.1 Struttura di c-Myc**

Schematizzazione delle principali caratteristiche di c-Myc: dominio N-terminale di transattivazione (TAD), box I, II e III, dominio di localizzazione nucleare (NLS), dominio di legame e dominio di dimerizzazione al DNA *helix-loop-helix-leucine zipper* (B-HLH-LZ). Gli eterodimeri MYC-MAX legano le sequenze E-box a livello delle regioni promotrici dei geni target.

## 1.1.2 ATTIVITA' BIOLOGICA DI C-MYC

### 1.1.2.1 Proliferazione e metabolismo cellulare

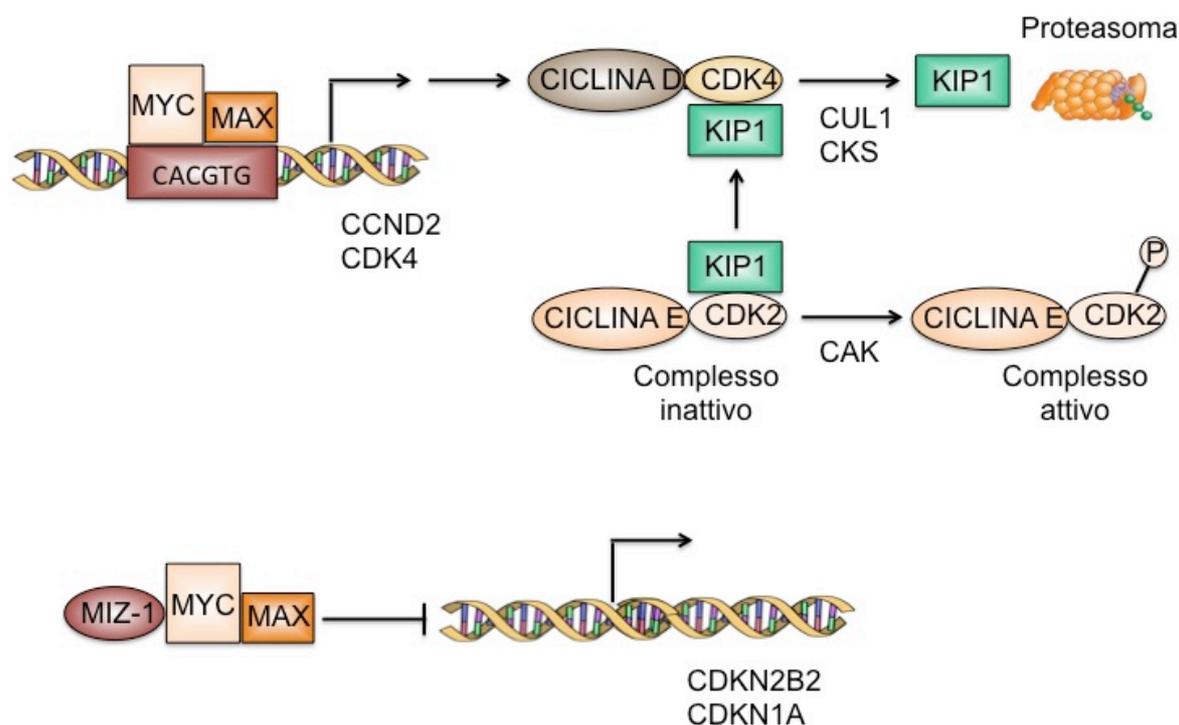
Il fattore trascrizionale c-Myc è strettamente legato alla proliferazione cellulare. La sua espressione aumenta in risposta a stimoli mitogeni e si riduce velocemente in presenza di segnali che bloccano la crescita cellulare<sup>29</sup>. Per questo motivo, l'attività di c-Myc è finemente controllata a livello trascrizionale, nel turnover del suo mRNA e a livello della stabilità della proteina. L'mRNA e la proteina c-Myc hanno una vita molto breve, rispettivamente di 10 minuti e 25 minuti, permettendo quindi un rapido adattamento alle esigenze della cellula<sup>29</sup>. Le cellule che ciclanò attraverso le varie fasi del ciclo cellulare sono caratterizzate dall'espressione di alti livelli di c-Myc, nelle cellule quiescenti, invece, i livelli di c-Myc diminuiscono rapidamente. I meccanismi che regolano il suo turnover comprendono sia il coinvolgimento di microRNA<sup>21-22</sup> sia la traduzione cap-dipendente<sup>23</sup>. Il processo di traduzione cap-dipendente regola la traduzione di molte oncoproteine, tra cui anche c-Myc. La proteina che determina l'attivazione della traduzione cap-dipendente è eIF4E. Quando la traduzione non è attiva, la proteina eIF4E è sequestrata dal suo inibitore, 4E-BP-1. Nel momento in cui subentrano stimoli intracellulari, mTOR o le chinasi PIM fosforilano la proteina 4E-BP-1 determinando il distacco di eIF4E. Successivamente al distacco dal suo inibitore, eIF4E può legare il cap me<sup>7</sup>G a livello dell'estremità 5' UTR dell'mRNA target determinando il corretto assemblaggio dell'apparato di traduzione e interagendo con la proteina eIF4G. La fosforilazione delle molecole che costituiscono il complesso d'inizio della traduzione determina la stabilizzazione dell'apparato, il corretto posizionamento delle subunità ribosomiali a livello del cap 7meGpppN e l'inizio della traduzione<sup>24</sup>.

La proteina c-Myc può subire anche alcune modifiche post-traduzionali che influenzano la sua stabilità. Esistono, infatti, due siti di fosforilazione a livello della regione N-terminale che regolano la stabilità della proteina<sup>25</sup>. La fosforilazione a livello della Ser62 indotta dalla chinasi ERK aumenta la stabilità di c-Myc. Al contrario, la fosforilazione della Thr58 da parte della GSK- $\beta$  induce la degradazione della molecola<sup>25</sup>. È interessante osservare che la Thr58 è localizzata in una *hotspot region* che molto spesso è mutata in alcune neoplasie ematologiche che includono anche BL (linfoma di Burkitt). Queste mutazioni puntiformi prevengono la fosforilazione della Thr58 preservando la proteina dalla degradazione<sup>26</sup>.

C-Myc regola la proliferazione cellulare modulando l'espressione genica di molecole chiave che regolano la progressione del ciclo in fase G1. Il primo target è rappresentato dalla proteina p27, inibitore dei complessi cicline/CDK (chinasi ciclina-dipendente) che regolano la progressione del ciclo cellulare<sup>14,27</sup>. C-Myc riduce sia livelli proteici sia l'attività di p27 attraverso due meccanismi. In primo luogo, c-Myc stimola la trascrizione dei geni CCND2 (che codifica per la ciclina D2) e CDK4 determinando il distacco di p27 dal

complesso ciclina E/CDK2 ed il suo sequestro nel complesso ciclina D2/CDK4<sup>14,27,29,30</sup>. Come secondo meccanismo, c-Myc può stimolare la degradazione di p27 nel proteasoma attraverso la trascrizione di altri due geni target, CUL1 e CKS<sup>14,31</sup>. Pertanto, attraverso questi due meccanismi, c-Myc previene il legame di p27 sul complesso ciclina E/CDK2 e rende il complesso più accessibile alla fosforilazione mediata dalla chinasi CAK. L'aumento dell'attività delle CDK2 e CDK4 determina quindi una iperfosforilazione della proteina Rb ed il rilascio della proteina E2F che può stimolare la trascrizione della ciclina E e dei geni necessari per l'ingresso della cellula nella fase S<sup>14,27</sup> (figura 1.2).

Recenti studi supportano l'idea che c-Myc possa esercitare delle influenze importanti sul ciclo cellulare anche reprimendo alcuni geni, come nel caso degli inibitori delle CDK CDKN2B e CDKN1A (p15<sup>INK4</sup> e p21<sup>WAF1</sup>). Questo due molecole sono coinvolte nell'arresto del ciclo cellulare vengono inattivate poiché gli eterodimeri c-Myc/MAX interagiscono con le molecole che attivano la trascrizione dei geni, MIZ1 e SP1. Questa interazione previene l'associazione dei fattori trascrizionali con il co-attivatore p300 e determina la conseguente inibizione della trascrizione di INK4B e WAF1<sup>14,20</sup>.



**Fig. 1.2 c-Myc promuove la progressione G1/S attraverso attivazione o repressione genica.**

(a) I dimeri c-Myc/MAX attivano la trascrizione dei geni target CCND2 (che codifica per la ciclina D2) e CDK4, che determinano il sequestro dell'inibitore delle CDK KIP1(p27). Successivamente la degradazione di KIP1 coinvolge altri due geni target di c-Myc, CUL1 e CKS. Non essendo più disponibile KIP1, il complesso ciclina E-CDK2 è fosforilato dalla chinasi CAK. (b) Gli eterodimeri C-Myc/MAX reprimono gli inibitori delle CDK, INK4B(p15) e WAF1 (p21), che sono coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare. Interagendo col fattore di trascrizione MIZ1, gli eterodimeri prevengono la transattivazione di CDKN2B(che codifica per INK4B) e CDKN1A (che codifica per WAF1).

L'attività di c-Myc risulta importante soprattutto nella fase G1 in cui la cellula inizia ad aumentare di massa e si prepara alla sintesi del DNA. Pertanto, non sorprende che molti dei geni target di c-Myc siano coinvolti nella sintesi proteica e contribuiscano all'accrescimento della massa cellulare. Infatti, c-Myc stimola la trascrizione di geni coinvolti nella biogenesi dei ribosomi, tra cui la nucleolina, la nucleofosmina, l'RNA elicasi ed una serie di proteine ribosomiali. Inoltre, c-Myc promuove la trascrizione di geni coinvolti nella formazione dell'apparato traduzionale come ad esempio nel caso dei fattori d'inizio della traduzione eIF2, eIF4E, eIF4G, proteine trasportatrici di amminoacidi, e l'enzima amminoacil-tRNA sintetasi<sup>28</sup>.

Per le cellule che si trovano in fase G1 tardiva, la capacità di sintetizzare e crescere è accoppiata ad un appropriato metabolismo energetico. Generalmente nelle cellule proliferanti che stanno per entrare in fase S si osserva un aumento della glicolisi piuttosto che della fosforilazione ossidativa. In particolare, è stato osservato che soprattutto le cellule cancerose, che sono caratterizzate da un elevato indice proliferativo, l'aumento della glicolisi è accoppiato ad un incremento dell'*up-take* di glucosio in cellula e ad un'elevata produzione di lattato. L'aumento del lattato nelle cellule neoplastiche è una conseguenza dell'incremento dei livelli di enzima lattato deidrogenasi A (LDH-A) che catalizza la reazione dell'acido piruvico in lattato. C-Myc è in grado di influenzare il metabolismo cellulare non solo stimolando la trascrizione dell'enzima lattato deidrogenasi A ma anche attivando l'espressione del trasportatore del glucosio GLUT1, promuovendo sia l'ingresso nella cellula di glucosio sia la produzione di lattato<sup>28,32</sup>. Più recentemente, alcune evidenze dimostrano che c-Myc è in grado di promuovere anche il processo di fosforilazione ossidativa attraverso la regolazione trascrizionale di un *network* di geni coinvolti nella funzionalità del mitocondrio<sup>28</sup>. Inoltre, c-Myc sembra ricoprire un ruolo fondamentale nella risposta cellulare all'ipossia attraverso l'interazione con i fattori trascrizionali maggiormente indotti durante una situazione di carenza di ossigeno, HIF1 $\alpha$  ed HIF2 $\alpha$ <sup>28</sup>.

### 1.1.2.2 *Apoptosi*

Oltre agli effetti sulla crescita cellulare, è stato dimostrato che c-Myc è in grado di stimolare il processo di apoptosi cellulare<sup>14</sup> (figura 1.3). Il riscontro di elevati livelli di espressione di c-Myc in concomitanza con un'aumentata apoptosi potrebbe sembrare paradossale visto che c-Myc è noto per la sua proprietà di stimolare la proliferazione. In realtà, questo potrebbe rappresentare un meccanismo salvaguardia che previene l'insorgenza del tumore nel caso in cui la proteina c-Myc non risultasse più soggetta ai meccanismi di regolazione e continui a stimolare la cellula a proliferare.

C-Myc influenza il *pathway* apoptotico estrinseco ed intrinseco attivando l'espressione di molti geni pro-apoptotici (p53, ARF1) e reprimendo la trascrizione di geni anti-apoptotici

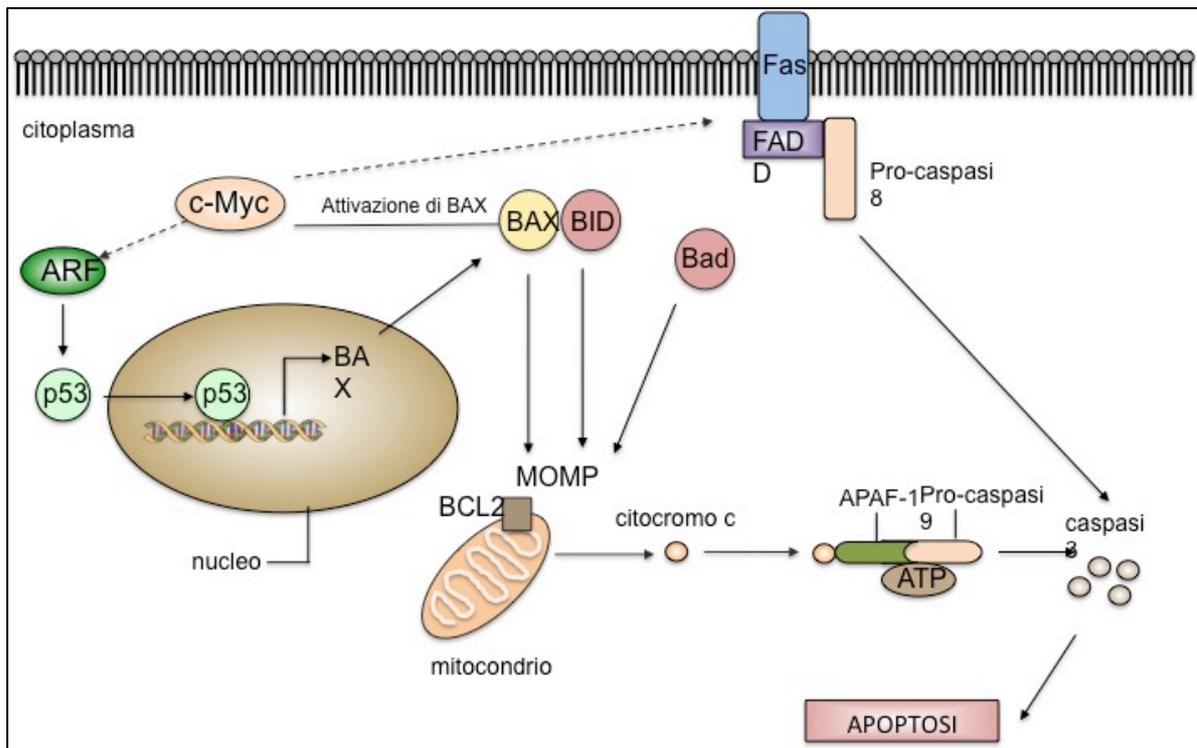
(BCL2)<sup>14</sup>. In condizioni fisiologiche, l'eccessivo aumento della proliferazione indotto da c-Myc è controbilanciato da un alto tasso di apoptosi. Al contrario, nei tumori caratterizzati da elevati livelli di c-Myc il programma apoptotico è evaso<sup>14</sup>.

L'espressione di c-Myc rende maggiormente sensibili le cellule ad una serie di stimoli pro-apoptotici che includono il danno al DNA, attivazione di *death receptor*<sup>33</sup> (Fas, TRAIL e TNF) o carenza di nutrienti. Uno dei meccanismi principali attraverso cui c-Myc stimola l'apoptosi coinvolge la stabilizzazione della proteina p53. L'oncosoppressore p53 ricopre un ruolo fondamentale nella cellula perché può stimolare il blocco del ciclo cellulare o l'apoptosi in risposta a segnali di stress cellulare o attivazione di oncogeni. In condizioni fisiologiche, i livelli di proteina p53 sono mantenuti bassi nella cellula dalla proteina MDM2, che ne induce la degradazione all'interno del proteasoma. Al contrario, il gene oncosoppressore ARF1 inibisce MDM2 preservando la degradazione di p53 ed aumentando i livelli intracellulari in caso di stress. C-Myc risulta direttamente coinvolto nell'attivazione di p53 stimolando la trascrizione di ARF1 mediata dal fattore di trascrizione FoxO che interagisce con il locus genico di ARF1 attivandone la trascrizione<sup>34-37</sup>. Un altro meccanismo attraverso cui c-Myc stimola l'attivazione di p53 risiede nel pathway ATM/ATR. E' risaputo che c-Myc è in grado di provocare instabilità genetica e che le chinasi ATM/ATR sono i principali regolatori del *network* di risposta ad un danno al DNA. Entrambe le chinasi stabilizzano p53 fosforilandola e impedendo il legame con MDM2. E' stato dimostrato in modelli cellulari di linfoma c-Myc positivi che l'attivazione di p53 può essere mediata da ATM/ATR e che la perdita di queste chinasi riduce la quota di apoptosi indotta da c-Myc aumentando il tasso di proliferazione cellulare<sup>37</sup>.

Il secondo meccanismo attraverso cui c-Myc può stimolare l'apoptosi promuove il rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio al citosol<sup>38</sup>, probabilmente attraverso l'attivazione della molecola pro-apoptotica Bax (BCL2 associated protein X)<sup>39</sup> mediante un meccanismo ancora non chiaro ma indipendente dal pathway Fas/FasL. L'attivazione di BAX determina la formazione di oligomeri e la loro migrazione dal citosol alla membrana mitocondriale. Una volta inseriti nella membrana del mitocondrio, gli oligomeri formano dei pori che determinano un cambiamento del potenziale di membrana (MOMP *Mitochondrial-Outer-Membrane Permeabilization*) ed il successivo rilascio del citocromo *c*. Una volta rilasciato nel citosol, il citocromo *c* si associa alla proteina APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) a formare l'apoptosoma, un complesso che attiva la caspasi 9. In presenza di ATP, la caspasi 9 viene clivata, portando alla attivazione di tutte le altre caspasi effettrici compresa la caspasi 3, che determina la degradazione di tutte le componenti cellulari.

C-Myc modula a diversi livelli il *network* di segnalazione del programma di apoptosi reprimendo proteine che stimolano segnali di sopravvivenza e up-regolando proteine coinvolte dei pathway apoptotici. In ogni caso, risulta abbastanza chiaro che il meccanismo attraverso cui c-Myc promuove l'apoptosi può dipendere dal tipo di cellula, dal contesto in

cui si trova oltre che alla presenza o assenza di ulteriori mutazioni in altri geni pro/anti-apoptotici<sup>14</sup>. Spesso, nei tumori che presentano l'attivazione dell'oncogene *c-Myc*, molte proteine e pathway coinvolti nel processo di apoptosi risultano danneggiati, pertanto il potenziale apoptotico di *c-Myc* viene perduto. Infatti, in molti tumori è possibile ritrovare mutazioni inattivanti a carico del gene di *p53* o di *Bax*, l'iperespressione di molecole antiapoptotiche come *BCL2* o ancora inattivazione dei pathway apoptotici mediati da *death receptors*. In questo modo, l'aumento dei fattori anti-apoptotici e l'inattivazione di proteine pro-apoptotiche sono in grado di esacerbare l'attività oncogenica di *c-Myc* e impedire la morte cellulare<sup>14</sup>.



**Fig. 1.3** *Pathway apoptotici modulati da c-Myc.*

*c-Myc* stimola l'apoptosi attivando molteplici stimoli. Durante il processo di apoptosi, *c-Myc* stimola il rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio, probabilmente attraverso l'attivazione della molecola pro-apoptotica BAX. L'attivazione di BAX determina la formazione di pori a livello della membrana mitocondriale e un cambiamento nel potenziale (MOMP). Una volta rilasciato nel citoplasma, il citocromo *c* si associa ad APAF-1 e alla pro-caspasi 9 a formare l'apoptosoma. In presenza di ATP, la caspasi 9 si attiva e determina l'attivazione delle caspasi esecutrici, inclusa la caspasi 3. Un altro pathway che coinvolge *c-Myc* nell'apoptosi include l'attivazione indiretta di *p53* attraverso ARF, determinando la trascrizione di BAX. *c-Myc* stimola, inoltre, l'apoptosi mediata da *death receptor*. L'interazione tra Fas/FasL e la proteina FADD determina il reclutamento e l'attivazione della caspasi 8 che, a sua volta attiva le caspasi esecutrici. La caspasi 8 può anche stimolare il pathway intrinseco attivando la proteina BID.

### 1.1.2.3 Modulazione di microRNA

Ad incrementare la complessità funzionale di c-Myc si aggiunge la capacità di c-Myc di modulare l'espressione di un certo numero di microRNA per promuovere ulteriormente il suo programma trascrizionale a favore della proliferazione cellulare<sup>9</sup>. Il meccanismo attraverso cui c-Myc modula la trascrizione di microRNA è diretto. Infatti, esperimenti di *chromatin immunoprecipitation* dimostrano che c-Myc interagisce direttamente a livello delle regioni promotrici dei microRNA attivandone o reprimendone la trascrizione<sup>9</sup>.

I microRNA rappresentano una nuova classe di piccole sequenze di RNA non-codificanti a singolo filamento costituiti da circa 21-25 nucleotidi che sono in grado di regolare al livello post-trascrizionale l'espressione genica. A seconda della complementarità più o meno perfetta a livello della regione 3' UTR del target, l'interazione microRNA/mRNA determina il clivaggio del messaggero oppure l'interruzione della sua traduzione. Nel genoma umano sono stati identificati più di 800 microRNA in grado di regolare il 74-92% degli mRNA e, per questo motivo, la deregolazione dei microRNA è spesso associata alla cancerogenesi. I geni codificanti per i microRNA sono spesso localizzati all'interno di regioni genomiche frequentemente alterate nel cancro, ma la deregolazione della loro espressione può essere legata anche ad altri meccanismi. In particolare, numerosi studi hanno dimostrato l'importanza dei microRNA nella maturazione cellulare e nello sviluppo dei linfomi B<sup>40</sup>. Infatti, la prima osservazione che ha collegato il processo di linfomagenesi ai microRNA è stata identificata in modelli cellulari di linfoma caratterizzati elevati livelli di proteina c-Myc.

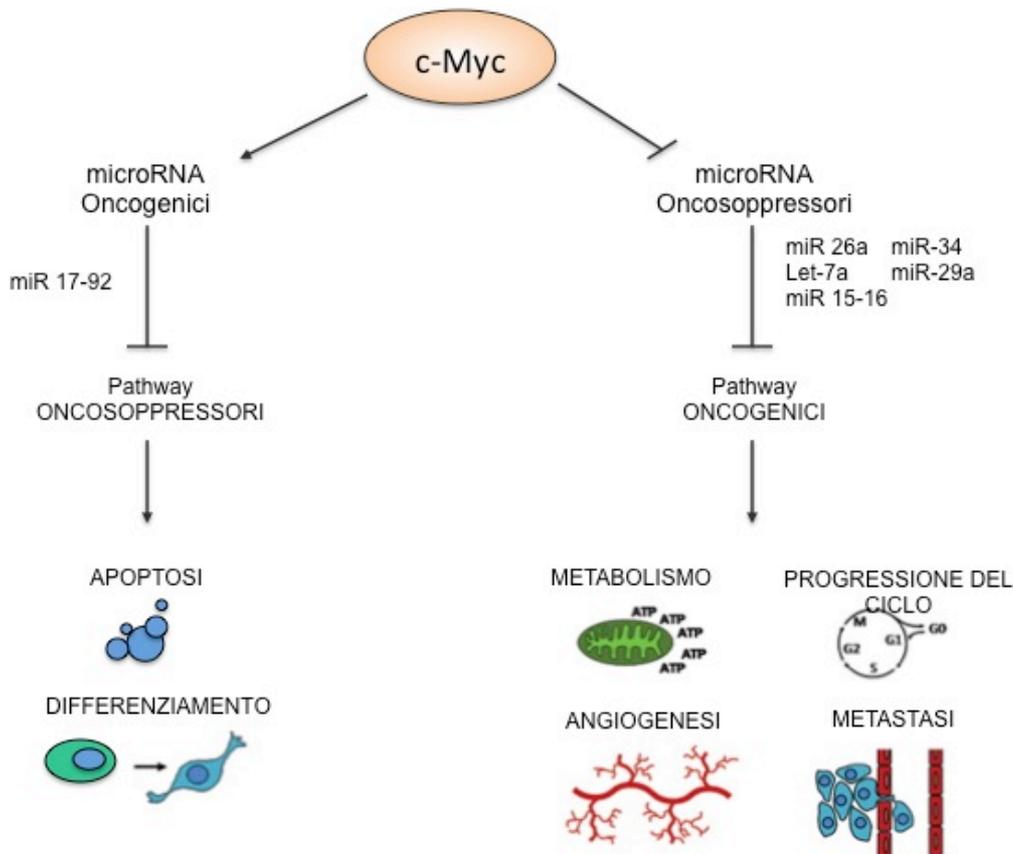
Il primo esempio di microRNA regolato da c-Myc è rappresentato dal cluster 17-92<sup>41</sup> che codifica per una set di microRNA strettamente correlati al processo di linfomagenesi<sup>47</sup>. Infatti, il cluster 17-92 è localizzato sul 13q31, un locus genico frequentemente amplificato nel linfoma di Burkitt, nel linfoma diffuso a grandi cellule, nel linfoma mantellare e nel linfoma follicolare<sup>42,43</sup>. Il trascritto primario che deriva dalla trascrizione di questo cluster di microRNA è costituito da un mRNA policistronico che successivamente è processato in sei microRNA maturi (miR-17, miR-18, miR19a, miR20a, miR19-b, miR-92a). E' interessante osservare che i microRNA del cluster 17-92 sono stati identificati come i microRNA maggiormente up-regolati e i più oncogenici dato che la loro espressione accelera in modo significativo la crescita di cellule di linfoma *in vivo*<sup>41</sup>. Il principale target del cluster dei miR17-92 è rappresentato dal fattore di trascrizione E2F1, una proteina pro-apoptotica che appartiene alla famiglia E2F<sup>44</sup>. Attraverso l'induzione della trascrizione dei suddetti microRNA e la conseguente down-modulazione dei livelli di E2F1, c-Myc inibisce i segnali pro-apoptotici e promuove il suo programma a favore della crescita cellulare. Più recentemente, all'interno del cluster 17-92, il ruolo pro-tumorigenico è stato attribuito principalmente ai miR-19a e miR19-b, giustificato da una consistente riduzione della tumorigenicità cellulare se i due microRNA vengono silenziati<sup>45</sup>. L'attività pro-tumorale

dei due microRNA è determinata dal fatto che entrambi sono in grado di inibire PTEN, la proteina che regola negativamente il pathway di segnalazione PI3K/Akt<sup>45</sup>. PTEN è un forte oncosoppressore in grado di abrogare i segnali di sopravvivenza ed è frequentemente mutato in molte tipologie di tumori, pertanto la sua inibizione determina una costante attivazione della chinasi Akt.

Sebbene c-Myc sia in grado di attivare direttamente la trascrizione del cluster pro-tumorigenico miR-17-92, in realtà la maggior parte dei microRNA regolati da c-Myc subiscono una forte repressione da parte di quest'ultimo<sup>9</sup>. Oltre al cluster dei miR-17-92, negli ultimi anni sono stati identificati molti altri microRNA regolati da c-Myc<sup>9</sup>. La maggior parte dei microRNA controllati da c-Myc sono dei putativi oncosoppressori e vengono fortemente repressi da c-Myc. Tra questi ritroviamo il miR15a/16-1, il miR-34, il miR29a e Let7a, le cui proprietà anti-tumorali sono già state precedentemente confermate<sup>9</sup>. Infatti, il miR-15a/16-1 ha come target principale la proteina anti-apoptotica BCL2 ed è fortemente represso da c-Myc in diverse neoplasie ematologiche<sup>12</sup>. Attraverso il reclutamento dell'HDAC3 a livello delle regioni promotrici, c-Myc induce una diminuzione dei livelli di acetilazione ed il conseguente silenziamento dei geni che codificano per i microRNA miR15a e miR16-1<sup>12</sup>. Il miR-34a, invece, è implicato nel *network* della proteina p53 e possiede una forte attività antiproliferativa e pro-apoptotica<sup>9,46</sup>. La potente attività antitumorale del microRNA Let-7a dipende invece dalla sua capacità di interferire a livello della traduzione di c-Myc<sup>22</sup>. L'espressione di questi microRNA in modelli cellulari di linfoma ha dimostrato una potente attività antitumorale. In particolare, l'espressione di Let7a in modelli cellulari di BL è in grado di down-regolare la proteina c-Myc e di arrestare la crescita delle cellule linfomatose<sup>22</sup>.

Un secondo microRNA che regola la stabilità di c-Myc e fortemente represso da quest'ultimo, sia in cellule primarie di BL sia in modelli murini transgenici E $\mu$ -Myc, è rappresentato dal miR-26a<sup>21</sup>. Il miR-26a è un esempio di microRNA con attività oncosoppressoria. Infatti, l'induzione dell'espressione del miR-26a in linee cellulari di linfoma riduce la progressione del ciclo cellulare *in vitro* generando un accumulo di cellule in fase G1. Le analisi del profilo di espressione genica hanno identificato EZH2 come il potenziale gene target di miR-26a. EZH2 è un membro del *polycomb-repressive-complex 2* (PRC2), un complesso che regola l'espressione genica altamente conservato a livello evolutivo. PRC2 è formato da tre proteine che costituiscono il core del complesso: EED, SUZ2 ed EZH2. All'interno del complesso, EZH2 possiede attività metiltransferasica ed è in grado di trimetilare in maniera specifica l'istone H3 a livello della lisina 27 (H3K27) provocando il silenziamento a livello epigenetico dei geni coinvolti nel differenziamento terminale e di geni oncosoppressori<sup>21</sup>. L'attività della proteina EZH2 sembra ricoprire un ruolo fondamentale a supporto della cancerogenesi, promuovendo la trascrizione genica di c-Myc. Infatti, nel cancro alla mammella è stato recentemente dimostrato che EZH2 attiva

l'espressione di c-Myc attraverso l'interazione con il pathway WNT/recettore per gli estrogeni, promuovendo la proliferazione delle cellule cancerose. Nel linfoma, invece, EZH2 reprime a livello trascrizionale il miR-494, che inibisce la traduzione dell'mRNA di c-Myc in proteina<sup>21</sup>. A sua volta, c-Myc contribuisce ad up-regolare la trascrizione di EZH2 inibendo il miR26a e generando un feedback positivo di regolazione che garantisce la sua stabilità ed il mantenimento del fenotipo neoplastico<sup>21</sup>.



**Fig. 1.4 Modulazione dei microRNA.**

c-Myc modula un complesso *network* di microRNA che contribuisce a promuovere la proliferazione cellulare. Attivando o reprimendo specifici microRNA, c-Myc modula diverse funzioni cellulari.

Recentemente è stata anche dimostrata una connessione tra i microRNA regolati da c-Myc e il metabolismo energetico in modelli cellulari di B-NHL. C-Myc è in grado di reprimere miR23a e miR-23b, due microRNA che bloccano la glutaminasi mitocondriale (GLS2), enzima indispensabile per la conversione della glutammina in glutammato, un precursore dell' $\alpha$ -chetoglutarato fondamentale per il ciclo degli acidi tricarbossilici<sup>48</sup>. L'induzione della trascrizione dei due microRNA induce un aumento del metabolismo della glutammina e genera una forte carenza di ATP nella cellula che innesca il processo di apoptosi cellulare.

La repressione/attivazione dei microRNA da parte di c-Myc rappresenta quindi un importante meccanismo che contribuisce alla linfomagenesi e al mantenimento della sua stessa stabilità (figura 1.4).

### 1.1.3 C-MYC E ONCOGENESI

Il fattore trascrizionale c-Myc rappresenta una delle proteine maggiormente deregolate in diverse tipologie di tumore e la sua iperespressione è spesso associata ad una cattiva prognosi<sup>1-8</sup>. Attraverso il reclutamento di complessi che rimodellano la cromatina, l'oncogene c-Myc modula la trascrizione di geni e di microRNA che contribuiscono a promuovere il suo programma trascrizionale a favore della crescita e della trasformazione neoplastica<sup>1,9</sup>.

La causa della deregolazione di c-Myc varia a seconda della tipologia di tumore. In molti tipi di cancro alti livelli di proteina c-Myc sono causati da alterazioni secondarie a livello dei *pathway* di segnalazione cellulare, generando un aumento degli stimoli proliferativi. In altri tumori, soprattutto ematologici, alti livelli di c-Myc sono una diretta conseguenza di aberrazioni genetiche che coinvolgono il locus genico di c-Myc<sup>1,3</sup>.

Il proto-oncogene c-Myc è stato inizialmente identificato come omologo dell'oncogene virale *v-Myc*, responsabile della mielocitomatosi aviaria<sup>49</sup>. In seguito, l'attivazione dell'oncogene c-Myc è stata identificata per la prima volta nel BL, come risultato di traslocazioni cromosomiche<sup>4</sup>. Nel 1958 il chirurgo inglese Dennis Burkitt descrisse per primo una tipologia di tumore che colpiva le ossa del cranio e l'addome di alcuni bambini africani che inizialmente fu classificato come una forma di sarcoma e successivamente fu identificato come un linfoma Non-Hodgkin a cellule B aggressivo, classificato come linfoma di Burkitt<sup>4</sup> (BL). Il BL è stato suddiviso in due sottotipi che differiscono dal punto di vista epidemiologico e a seconda della distribuzione geografica ma con una caratteristica bio-molecolare comune: l'espressione deregolata del fattore trascrizionale c-Myc<sup>4</sup>. In seguito, è stato dimostrato che l'iperespressione della proteina è una diretta conseguenza della traslocazione genica del locus di c-Myc sotto il controllo delle regioni promotrici delle catene pesanti o, meno frequentemente, delle catene leggere dei geni che codificano per le Ig<sup>4</sup>. Successivamente, il potenziale oncogenico di c-Myc nelle cellule emopoietiche è stato confermato a metà degli anni '80 mediante l'utilizzo di topi transgenici che esprimono il gene di c-Myc sotto il controllo dei promotori dei geni delle Ig (*E $\mu$ -Myc*), mimando in questo modo la traslocazione cromosomica che avviene generalmente nel BL<sup>50</sup>. Questi topi modificati geneticamente sviluppavano linfomi a cellule B clonali nel 90% dei casi dopo un periodo di latenza di 4-6 mesi confermando il ruolo centrale di c-Myc nel processo di linfomagenesi<sup>50</sup>.

Le traslocazioni genetiche che coinvolgono il gene di c-Myc sono una caratteristica distintiva del BL che risulta indispensabile per la diagnosi di questa tipologia di linfoma<sup>4</sup>. In realtà, alterazioni a livello del locus genico di c-Myc non sono specifiche del BL ma sono presenti anche in altri sottotipi di linfomi come il diffuso a grandi cellule (DLBCL), il follicolare (FL) e il mantellare (MCL)<sup>51</sup>. La frequenza delle aberrazioni geniche che coinvolgono il locus di c-Myc nelle altre patologie linfoproliferative sembra essere poco comune ma non rara<sup>51</sup>. A differenza del BL in cui l'iperespressione di c-Myc ha valenza diagnostica, nelle altre tipologie di linfomi è fortemente prognostico e risulta strettamente associato ad un andamento clinico peggiore. Infatti, i linfomi c-Myc positivi sono clinicamente molto aggressivi, molto più resistenti alle terapie standard e associati ad alta mortalità. Inoltre, le aberrazioni genetiche che coinvolgono il locus genico di c-Myc in altre categorie di linfomi avvengono generalmente in un contesto cariotipico già molto complesso e in associazione ad altre lesioni genetiche, pertanto i riarrangiamenti genici che coinvolgono c-Myc possono rappresentare degli eventi secondari<sup>51</sup>.

Più recentemente, un'elevata espressione della proteina c-Myc è stata ritrovata anche in tumori solidi scarsamente differenziati e caratterizzati da un'elevata aggressività<sup>3</sup>. Ad esempio, amplificazioni del locus genico di c-Myc sono state ritrovate nel cancro alla mammella e nel cancro prostatico. Nel melanoma, invece, la proteina c-Myc è spesso overespressa sebbene alterazioni geniche siano pressochè assenti. In ogni caso, l'iperespressione di c-Myc correla con un andamento clinico peggiore<sup>3</sup>.

## 1.2 LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE B C-MYC POSITIVI

### 1.2.1 EZIOPATOGENESI DEI LINFOMI NON-HODGKINA CELLULE B

I NHL (*Non-Hodgkin lymphomas*) rappresentano un gruppo di patologie linfoproliferative clonali che originano dai linfociti B o T maturi situati nel tessuto linfoide (linfonodi, milza e altri organi del sistema immunitario). Circa l'80-85% dei NHL origina dai linfociti B (B-NHL)<sup>52</sup>.

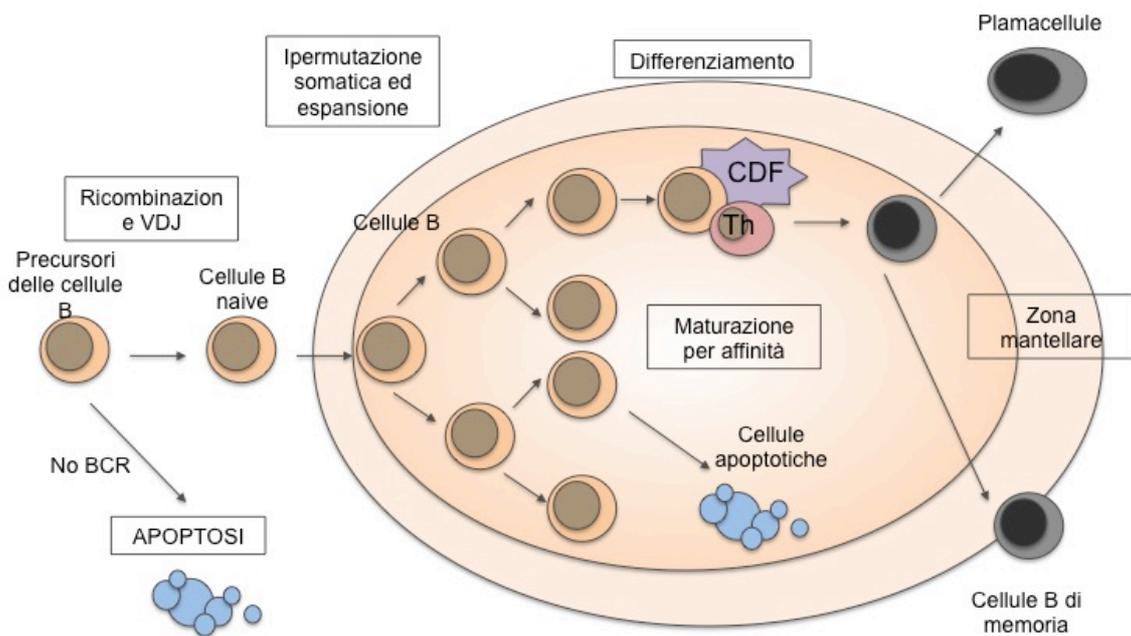
Comunemente, i B-NHL sono classificati come "aggressivi" (ad alto grado di malignità) o "indolenti" (a basso grado di malignità) in base al loro comportamento clinico. I linfomi indolenti sono caratterizzati da un decorso non aggressivo che consente in genere una lunga sopravvivenza anche quando non si ottiene un'eradicazione completa della malattia. I linfomi aggressivi, invece, sono costituiti da un rapido decorso clinico e da una breve sopravvivenza nei casi non responsivi ai trattamenti<sup>52</sup>.

I diversi sottotipi di B-NHL possono derivare dall'espansione di cloni maligni di cellule B a diversi stadi del processo maturativo (figura 1.5). Dato che in ogni fase di maturazione la cellula B presenta caratteristiche differenti, i profili di espressione di diversi marcatori di differenziamento e la specifica localizzazione tissutale del clone neoplastico, sono importanti per definire l'origine e il sottotipo di linfoma. Per questo motivo, è fondamentale conoscere la struttura, la composizione cellulare, i cambiamenti nell'espressione genica e gli eventi molecolari implicati nel differenziamento e nella funzione dei linfociti B normali<sup>52</sup>.

La maturazione delle cellule B inizia nel midollo osseo e segue diversi stadi maturativi che sono caratterizzati da una specifica struttura del BCR (*B-cell receptor*). La maturazione del BCR avviene attraverso un processo denominato "error prone", che induce il riarrangiamento dei loci genici delle regioni V, D e J delle catene pesanti delle Ig ed il loci genici V e J delle catene leggere delle Ig<sup>52</sup>. A questo livello di maturazione le cellule B mature esprimono sulla membrana un BCR composto da due catene pesanti e due catene leggere identiche che sono legate covalentemente da ponti disolfuro. Il riconoscimento di un antigene da parte delle cellule B *naive*, determina il loro reclutamento all'interno di organi linfoidei secondari dove subiscono una serie di reazioni all'interno del centro germinativo. Grazie all'espressione e all'attivazione dell'enzima AID (*activation-induced cytidine deaminase*), queste cellule vanno incontro ad un processo di ipermutazione somatica delle regioni variabili dei geni che codificano per le Ig che determina la formazione di cellule B con una elevata (o ridotta) affinità per un particolare antigene. Inoltre, le cellule B subiscono un ulteriore processo di ipermutazione a livello dei loci delle catene pesanti che determina una commutazione di classe dell'Ig da IgM a IgG, IgA o IgE<sup>53-55</sup>. Queste reazioni avvengono nella *dark zone* del centro germinativo, in cui le cellule B, tramite la stimolazione da parte di antigeni espressi sulla superficie delle cellule T circostanti e di antigeni

presentati dalle cellule dendritiche follicolari, iniziano rapidamente a dividersi diventando centroblasti. Alcune di queste cellule entrano periodicamente nella *light zone* del centro germinativo, dove iniziano a testare la loro capacità di riconoscimento degli antigeni presentati dalle cellule dendritiche follicolari. La contemporanea stimolazione tramite il CD-40 delle cellule T *helper*, favorisce la transizione da centroblasto a centrocita proliferante fino a plasmacellula matura che possiede un BCR con un'elevata affinità per uno specifico epitopo antigenico: solo queste cellule saranno selezionate positivamente<sup>54</sup>. Queste modifiche citogenetiche sono essenziali durante una risposta immunologica ma possono determinare mutazioni accidentali o danni al DNA che possono diventare patologiche<sup>56</sup>.

Il processo di attivazione e maturazione delle cellule B all'interno del centro germinativo è finemente regolato da una serie di fattori di trascrizione. Uno di questi fattori è rappresentato dalla proteina BCL-6 che reprime la trascrizione di molti geni coinvolti nella morte cellulare, nella risposta al danno al DNA e nel differenziamento plasmacellulare<sup>56</sup>. IRF4, invece, rappresenta la molecola responsabile del differenziamento plasmacellulare<sup>57</sup>, determinando l'aumento dell'espressione del repressore di BCL-6, Blimp-1, e provocando il differenziamento terminale<sup>58</sup>.



**Figura 1.5: Differenziamento delle cellule B.**

Le cellule B attivate *naïve* che ricevono segnali "helper" sono guidate ai follicoli di cellule B negli organi linfoidi secondari, come i linfonodi, dove costituiscono il centro germinativo (CG). Le cellule B proliferanti del centro germinativo sostituiscono le cellule B IgM+IgD+ all'esterno del follicolo, dove formano la zona mantellare. All'interno del centro germinativo, è possibile distinguere una *dark zone*, con cellule B proliferanti del CG, e una *light zone*, contenente cellule B quiescenti del CG. Le cellule B del CG proliferanti vanno incontro al processo di ipermutazione somatica nelle regioni Ig V e, quando acquisiscono un'aumentata affinità per l'antigene, sono selezionate positivamente attraverso l'interazione con le cellule T CD4+ (Th) e le cellule dendritiche follicolari (CDF) nella *light zone*. Una frazione delle cellule B del CG va incontro a ricombinazione per la commutazione di classe delle Ig e, finalmente, differenziano in cellule B di memoria o in plasmacellule e lasciano il microambiente del centro germinativo

I linfomi possono originare in uno di questi stadi maturativi dei linfociti B, di conseguenza, la struttura del BCR, l'espressione dei markers di differenziamento e la localizzazione del clone neoplastico definiscono l'origine ed il sottotipo di linfoma<sup>52</sup>. Una caratteristica peculiare di molti linfomi a cellule B, che è usata anche come marker diagnostico, è la presenza di specifiche traslocazioni cromosomiche reciproche che, in genere, coinvolgono uno dei loci delle Ig e un proto-oncogene, e che sono responsabili della perdita dei meccanismi di controllo che regolano la crescita, la proliferazione, la maturazione dei linfociti e determinano, di conseguenza, la trasformazione linfomatosa<sup>59</sup>. Al contrario di ciò che succede durante il programma di differenziamento della loro controparte normale, le cellule B maligne perdono i meccanismi di regolazione fisiologici. Ad esempio, i centroblasti normali perdono gli stimoli proliferativi da parte delle proteine c-Myc ed NF- $\kappa$ B e vanno incontro a morte cellulare. I centroblasti maligni, invece, diventano resistenti alla morte cellulare tramite l'acquisizione di traslocazioni che coinvolgono c-Myc o la costitutiva attivazione del pathway di segnalazione di NF- $\kappa$ B che determinano la costante stimolazione della proliferazione. I vantaggi proliferativi e di sopravvivenza acquisiti tramite l'espressione costitutiva di un oncogene e/o la delezione/inattivazione di un oncosoppressore rappresentano quindi il motore per un'espansione incontrollata del clone maligno di cellule B<sup>59,52</sup>.

## 1.2.2 CARATTERISTICHE DEI LINFOMI NON-HODGKINA CELLULE B C-MYC POSITIVI

### 1.2.2.1 *Linfoma di Burkitt*

Il BL appartiene alla categoria dei linfomi aggressivi ed è un tumore tipicamente pediatrico che colpisce principalmente bambini e giovani adulti. E' caratterizzato da una crescita molto veloce con un tempo di duplicazione di 24-48 ore<sup>4</sup>.

Questa tipologia di linfoma è stata suddivisa in due varianti cliniche molto simili dal punto di vista della morfologia, dell'immunofenotipo e delle caratteristiche genetiche ma differenti dal punto di vista epidemiologico e geografico<sup>4</sup>. La variante endemica è generalmente associata alle aree geografiche colpite dalla malaria e può essere positiva per l'infezione al virus EBV<sup>4</sup>. La variante sporadica, invece, si riscontra nel nord America e nelle regioni europee ed è raramente associata all'infezione di EBV. Il BL rappresenta l'1-2% dei linfomi dell'adulto e il 30-40% dei linfomi pediatrici nel continente europeo e nel nord America<sup>4</sup>. L'incidenza annuale del BL endemico è del 40-50% per i bambini al di sotto dei 18 anni, mentre nelle aree a rischio rappresenta circa a metà dei tumori diagnosticati in età pediatrica e più del 90% dei linfomi<sup>4</sup>. Il BL sporadico, invece, ha un'incidenza molto più bassa e colpisce due bambini al di sotto dei 18 anni su un milione<sup>4</sup>.

Approfondite osservazioni suggeriscono che l'infezione da parte del virus EBV potrebbe

ricoprire un ruolo importante nella patogenesi della malattia. Infatti, EBV è spesso presente in questi tumori e l'infezione virale precede il processo di tumorigenesi. Inoltre, nel sottotipo endemico, sono stati ritrovati anche proteine e microRNA virali che potrebbero contribuire allo sviluppo della linfomagenesi. Tuttavia, il meccanismo che collega EBV al processo di tumorigenesi non è stato ancora pienamente chiarito<sup>4</sup>.

Da un punto di vista morfologico, il BL è caratterizzato da cellule di media grandezza e da un indice proliferativo del 100%, con un alto turnover cellulare dimostrato da un'aumentata apoptosi. Infatti, da un punto di vista istologico, il BL ha un aspetto tipico definito "a cielo stellato", determinato dalla presenza di cellule macrofagiche che fagocitano i detriti cellulari. Le cellule B risultano negative per BCL-2 e positive per gli antigeni CD20 CD79a. Le molecole CD10 e BCL-6 invece sono co-espresse<sup>60</sup> (figura 1.6).

La traslocazione t(8;14) (p24;q32) rappresenta la caratteristica biomolecolare distintiva del BL ed è riscontrata nel 70-80% dei pazienti in assenza di altre anomalie a livello del cariotipo. Traslocazioni alternative, t(2;8) (p12;q24) e t(8;22) (q24;q11), sono state ritrovate nel restante 10-15% dei pazienti<sup>4</sup>. La diagnosi della malattia viene stabilita sulla base della presenza di una delle tre traslocazioni che hanno come conseguenza molecolare l'attivazione del proto-oncogene c-Myc. L'iperespressione di c-Myc è determinata dalla traslocazione del gene sotto il controllo delle regioni promotrici di uno dei geni che codificano per le catene pesanti al 14q32, per le catene leggere *k* al 2p12 o per le catene leggere *λ* al 22q11 delle Ig<sup>4</sup>. Inoltre, nel 30% dei casi, il BL presenta una diminuzione dei livelli di proteina p53, in seguito a mutazioni della sequenza genica o a causa di una iperespressione del suo repressore, MDM2<sup>4</sup>.

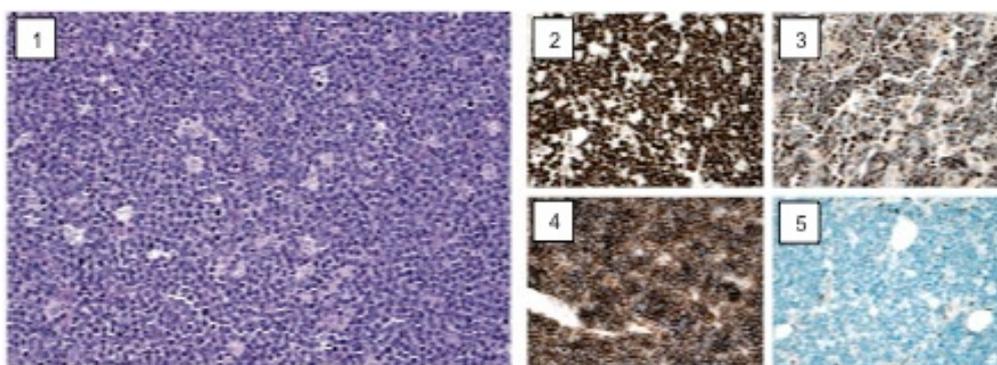


Fig.1.6 *Linfoma di Burkitt*

(1) Colorazione con ematossilina ed eosina. Analisi immunoistochimica dei marcatori Ki-67 (2), Bcl-6 (3), CD20 (4) e Bcl-2 (4).

Prima dell'introduzione di uno schema terapeutico aggressivo, il BL era una neoplasia rapidamente fatale; con l'applicazione di schemi di trattamento di tipo pediatrico in cui si predilige l'intensità di dose si sono ottenuti risultati incoraggianti. Infatti, dato l'alto indice proliferativo, si utilizzano cicli di chemioterapia, prevalentemente con agenti alchilanti, a dosaggi convenzionali ma con alta intensità di dose. Sebbene l'introduzione di questi

programmi terapeutici consenta di guarire una discreta quantità di pazienti, la prognosi rimane poco favorevole in caso di malattia disseminata al midollo osseo e/o al sistema nervoso centrale e nei pazienti più anziani in cui gli schemi pediatrici sono gravati da elevata tossicità<sup>4</sup>.

### ***1.2.2.2 Linfoma diffuso a grandi cellule***

Il linfoma diffuso a grandi cellule (DLBCL) rappresenta il sottogruppo più frequente di B-NHL, pari circa al 30% dei NHL.

Il DLBCL è un tumore a grandi cellule B che comunemente cresce con un *pattern* diffuso, sovvertendo completamente l'architettura di un normale linfonodo. Nonostante presenti questa caratteristica comune, a livello clinico, biologico e istologico è estremamente eterogeneo. Per definire l'eterogeneità istogenetica del DLBCL è stato utilizzato lo studio dei profili di espressione genica (GEP). Tale approccio ha permesso di suddividere i DLBCL in due sottogruppi principali: *germinal center B-like* (GBC) e *activated B cell-like* (ABC)<sup>61</sup>.

Le profonde differenze a livello di espressione genica e delle alterazioni genetiche identificate suggeriscono che questi due sottotipi di DLBCL originano da due differenti precursori cellulari e che la trasformazione maligna avviene attraverso meccanismi diversi. I DLBCL-GBC sembrano originare dal centro germinativo, mentre i DLBCL-ABC sembrano derivare da linfociti post-centro germinativo<sup>61</sup>.

Il clone maligno nel sottotipo GBC è bloccato nelle reazioni del centro germinativo e va continuamente incontro ad un processo di ipermutazione somatica finché non avviene un cambiamento di classe a IgH<sup>62</sup>. Questi linfomi sono caratterizzati da specifiche lesioni genetiche come ad esempio la traslocazione t(14;18), la delezione dell'oncosoppressore PTEN, l'amplificazione del cluster di microRNA 17-92 e mutazioni a carico del gene di p53. Nel sottotipo ABC, invece, l'espressione costitutiva del pathway di NF-κB promuove l'espressione del fattore di trascrizione IRF4, portando all'attivazione del programma d'espressione genica tipico delle plasmacellule<sup>61,63</sup>. Inoltre, il clone neoplastico acquisisce delle lesioni a livello genetico che, interferendo con l'attività trascrizionale di Blimp-1, bloccano il completo differenziamento in plasmacellule mature. La costitutiva attivazione del fattore trascrizionale NF-κB nel sottotipo ABC è da ascrivere principalmente alle mutazioni a carico dell'oncogene CARD11 (presenti nel 20% dei casi) e alla costitutiva attivazione del BCR. Infatti, circa il 20% dei linfomi appartenenti al sottotipo ABC presenta mutazioni a carico delle subunità CD79a e CD79b del BCR che aumentano l'espressione del BCR e riducono l'attivazione del feedback di regolazione negativo. Mutazioni a carico del BCR sono pressoché assenti nei linfomi GBC, mentre nei linfomi ABC rappresentano una caratteristica indispensabile che determina la costante attivazione di pathway proliferativi che coinvolgono MAP chinasi e PI3K<sup>64</sup>.

La prognosi dei DLBCL è estremamente eterogenea e, nonostante sia sensibilmente migliorata negli ultimi anni, i fattori predittivi della risposta non sono ancora del tutto noti.

In generale, i pazienti con DLBCL-GBC rispondono meglio alla terapia e hanno una prognosi più favorevole, mentre i pazienti con DLBCL-ABC sono meno responsivi alle terapie convenzionali e sono caratterizzati da un andamento clinico peggiore.

Un marcatore di cattiva prognosi nel DLBCL è rappresentato dalla proteina c-Myc. E' stato dimostrato che la deregolazione di c-Myc, eventualmente associata nel 10% dei casi a traslocazioni geniche, è un fattore prognostico negativo indipendente<sup>47</sup>. Infatti, i DLBCL c-Myc positivi sono caratterizzati da un andamento clinico peggiore rispetto alle altre tipologie di DLBCL mostrando un tasso di sopravvivenza media nei successivi 5 anni del 44% rispetto al 67% dei DLBCL c-Myc negativi. In particolare, la presenza di alti livelli di c-Myc riduce la prognosi favorevole del sottotipo DLBCL-GBC che generalmente risponde meglio alle terapie convenzionali. Anche nei pazienti in età pediatrica, che presentano tassi di risposta maggiori rispetto ai pazienti adulti, la presenza della traslocazione t(8;14) riduce significativamente la sopravvivenza<sup>51</sup>.

L'impatto negativo di c-Myc è spesso legato agli effetti cooperativi di un secondo marker di prognosi sfavorevole, BCL-2, che nel 74-84% dei casi risulta coespresso nei cosiddetti linfomi DLBCL "double hit"<sup>51,2,5</sup>. L'iperespressione della proteina anti-apoptotica BCL-2 è una conseguenza diretta della traslocazione genica t(14;18) che avviene tipicamente nel FL e che porta il gene di BCL-2 sotto il controllo delle regioni promotrici dei geni che codificano per le catene pesanti delle Ig. Sebbene non si conosca quale delle due aberrazioni avvenga per prima, la co-presenza della traslocazione di BCL-2 nei DLBCL che presentano riarrangiamenti di c-Myc determina un effetto additivo in termini di prognosi sfavorevole<sup>2-5</sup>.

### **1.2.2.3 Altre tipologie di linfomi**

Il FL (*follicular lymphoma*) appartiene alla categoria dei linfomi indolenti ed è caratterizzato da una morfologia nodulare, da cellule B mature CD10+ e dalla traslocazione t(14;18) presente nel 90% dei casi. La presenza di c-Myc nel FL è piuttosto rara ed è stata descritta nel 2-8% dei casi. Tuttavia, la frequente sovrapposizione delle caratteristiche immunofenotipiche del FL e DLBCL rende molto difficile quantificare l'effettiva frequenza di traslocazioni di c-Myc nel contesto dei FL. Generalmente, risulta molto comune l'acquisizione di aberrazioni genetiche che coinvolgono il locus di c-Myc al momento della trasformazione in linfoma aggressivo, determinando un peggioramento della prognosi<sup>51,8</sup>.

Un altro B-NHL che occasionalmente presenta il riarrangiamento di c-Myc è rappresentato dal MCL (*mantle cell lymphoma*). La caratteristica biomolecolare distintiva di questa tipologia di linfoma è rappresentata dalla traslocazione t(11;14) che genera l'iperespressione della ciclina D1 e la deregolazione del ciclo cellulare. Sebbene il MCL sia caratterizzato da lesione genetiche multiple e da un cariotipo molto complesso, aberrazioni che coinvolgono il locus genico di c-Myc sono poco frequenti. Anche se rare, le

traslocazioni di c-Myc determinano anche in questo caso un forte impatto prognostico negativo<sup>51,7</sup>.

### 1.3 HDAC INIBITORI COME AGENTI ANTI-NEOPLASTICI

Le modifiche epigenetiche sono definite come cambiamenti ereditabili dell'espressione genica che non derivano da alterazione della sequenza genica. L'acetilazione delle proteine istoniche rappresenta una delle possibili modifiche post-traduzionali e rappresenta il risultato del bilanciamento dell'attività di due classi di enzimi: gli HAT e gli HDAC<sup>65</sup>. Questi enzimi regolano finemente l'espressione genica attraverso il *folding* della cromatina in seguito alle differenti modifiche post-traduzionali apportate alle code istoniche<sup>65</sup>. Più precisamente, gli HDAC e gli HAT determinano l'accesso alla macchina di trascrizione sul DNA modificando l'architettura della cromatina agendo sui nucleosomi<sup>65</sup>. In generale, gli HAT funzionano come complessi che includono molecole co-repressorie e co-attivatrici e sono responsabili dell'attivazione trascrizionale in seguito ad un rilassamento della cromatina generato da un aumento dell'acetilazione istonica. Gli HDAC, invece, partecipano a complessi macromolecolari con differenti proteine come SMRT, N-Cor, Sin3 o NURD. A differenza degli HAT, gli HDAC sono coinvolti nella repressione trascrizionale in quanto inducono un compattamento della cromatina in seguito alla rimozione dei gruppi acetili a livello degli istoni<sup>65,66</sup>. Gli HDAC agiscono come repressori trascrizionali mantenendo bassi i livelli di acetilazione e impedendo alla RNA polimerasi II di legare le regioni promotrici dei geni target. Dato il forte ruolo di questi enzimi nella regolazione della trascrizione, non sorprende che alterazioni a livello dell'attività degli HAT o HDAC siano state ritrovate in molti tipi di cancro. Pertanto, si è ipotizzato di poter sfruttare HDAC inibitori per sovvertire il fenotipo neoplastico.

Gli HDAC inibitori rappresentano un'interessante classe di farmaci anti-tumorali che bloccano la progressione delle cellule neoplastiche inibendo gli enzimi HDAC e, di conseguenza, modificando l'espressione genica. In numerosi studi preclinici, alcune classi di HDAC inibitori hanno dimostrato di possedere una spiccata attività antitumorale sebbene non siano ancora stati verificati pienamente i meccanismi alla base di questa attività. Alcuni di questi inibitori sono stati testati in trial clinici per tumori solidi o ematologici. In particolare, in termini di efficacia clinica, una maggiore sensibilità a questi inibitori è stata riscontrata nelle neoplasie ematologiche. Infatti, con differenti HDAC inibitori sono stati ottenuti buoni risultati nel linfoma T periferico, nel linfoma T cutaneo, nel linfoma di Hodgkin e nella leucemia mieloide acuta. Sulla base di questi risultati clinici, il Vorinostat (SAHA) e più recentemente la Romidepsina (FK-228) sono stati approvati dall'FDA per il trattamento dei linfomi a cellule T cutanei<sup>68</sup>.

### 1.3.1 CLASSIFICAZIONE E RUOLO BIOLOGICO DEGLI HDAC

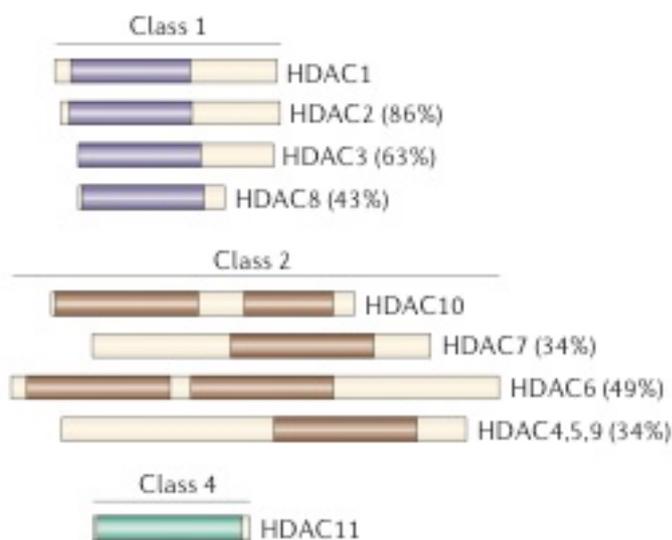
Le modifiche epigenetiche sono cambiamenti ereditari nell'espressione genica che non determinano alterazioni a carico della sequenza del DNA. I meccanismi più comuni di regolazione epigenetica includono la metilazione delle isole CpG all'interno del DNA e l'acetilazione dei residui di lisina all'N-terminale delle code degli istoni. Gli enzimi DNMT e DNA demetilasi, così come gli HAT e HDAC agiscono in maniera coordinata per silenziare o attivare l'espressione di specifici geni<sup>65</sup>.

Lo stato di acetilazione degli istoni è determinante per la regolazione dell'espressione genica e viene regolato dagli HAT e HDAC. Gli HAT trasferiscono gruppi acetile dall'acetil-CoA ai residui N-terminali degli istoni, mentre gli HDAC catalizzano la rimozione di tali gruppi. Attraverso l'acetilazione o la deacetilazione degli istoni, e le conseguenti modifiche strutturali dei nucleosomi e della cromatina, questi enzimi inducono il reclutamento dell'apparato trascrizionale verso siti specifici di DNA, determinando l'espressione di alcuni geni e il silenziamento di altri, pur non alterando la loro sequenza. La presenza di lisine acetilate è un segnale positivo per la trascrizione e determina un rilassamento della cromatina; la deacetilazione, invece, induce compattazione della cromatina e, di conseguenza, silenziamento trascrizionale. Questo accade perché la deacetilazione degli istoni aumenta le interazioni tra le code degli istoni e il DNA, la cromatina si compatta e si ha una diminuzione dell'accessibilità al DNA da parte dell'apparato trascrizionale. Pertanto, modulando l'acetilazione degli istoni, gli HDAC/HAT influenzano la conformazione della cromatina, l'accessibilità ai fattori di trascrizione e, di conseguenza, l'espressione genica. Il ruolo degli HDAC e degli HAT nel definire il "codice istonico" è ben documentato e sembra essere strettamente connesso all'attività di altri enzimi e di altre proteine responsabili del processo di rimodellamento della cromatina<sup>65-67</sup>.

Nell'uomo, la famiglia degli HDAC comprende 18 geni suddivisi in 4 classi sulla base della loro omologia di sequenza, della localizzazione sub-cellulare e dell'attività enzimatica (figura 1.7). Tra queste, la classe III costituisce un gruppo separato strutturalmente e non dipendente dal NAD. Tutti gli altri HDAC appartengono alle classi I, II e IV e sono accomunati da un'attività enzimatica Zinco-dipendente che è alla base dell'interazione con gli inibitori<sup>65-67</sup>.

La classe I include gli HDAC1, 2, 3, e 8 ed è localizzata nel nucleo. Sulla base della filogenesi è possibile dividere ulteriormente questa classe in IA (HDAC1 e 2), IB (HDAC3) e IC (HDAC8). Gli HDAC4, 5, 6, 7, 9 e 10 appartengono alla classe II e possono muoversi da e verso il nucleo a seconda dei segnali che ricevono. Questa classe può essere a sua volta suddivisa in IIA (HDAC4, 5, 7 e 9) e IIB (HDAC6 e 10) sulla base della presenza di un doppio dominio di deacetilazione tipico dell'HDAC6 e 10. In particolare, l'enzima HDAC6 è principalmente citosolico e si trova associato ai microtubuli dove regola la

polimerizzazione della tubulina modulandone lo stato di acetilazione. La classe IV, infine, è costituita da un solo membro, l'HDAC11, e rappresenta un gruppo atipico che condivide solo un'alta omologia di sequenza con i componenti delle classi I e II. Nella cellula tutti gli HDAC, ad eccezione dell'HDAC8, mediano le loro funzioni attraverso la formazione di complessi macromolecolari che molto spesso comprendono più di un HDAC e proteine co-repressorie come Sin3A, N-Cor e SMRT. In particolare, l'HDAC1 e l'HDAC2 interagiscono tra loro formando il nucleo catalitico di complessi multiproteici tra cui i complessi Sin3A, NURD e Co-Rest, mentre l'HDAC3 è stato generalmente trovato associato a complessi con le proteine N-Cor e SMRT. L'HDAC6, invece, è stato spesso ritrovato in macro-complessi che sono coinvolti nel *pathway* dell'ubiquitina. HDAC appartenenti a diverse classi possono quindi coesistere negli stessi complessi e regolare la loro attività reciprocamente. Inoltre, l'attività degli HDAC è regolata da differenti meccanismi come ad esempio da modifiche post-traduzionali (acetilazione, sumoilazione, fosforilazione), dalle interazioni proteina-proteina o ancora dalla presenza/assenza di cofattori indispensabili per la loro attività enzimatica<sup>65-67</sup>.



**Fig 1.7 Famiglia degli enzimi iston deacetilasi.**

Rappresentazione schematica degli enzimi HDAC. I domini catalitici di ciascuna classe sono rappresentati in differenti colori mentre la percentuale di omologia di sequenza tra gli HDAC appartenenti alla stessa classe è riportata tra parentesi. Tutti gli HDAC mostrano un dominio catalitico zinco-dipendente con un'alta omologia. I domini accessori (associati a funzioni regolatorie), invece, risultano quelli meno conservati.

Negli ultimi anni sono cresciute le evidenze che supportano l'idea che l'attività dei diversi HDAC non è limitata agli istoni ma coinvolge anche substrati non-istonici come fattori di trascrizione, enzimi che riparano il DNA, proteine *chaperone* e proteine strutturali (figura 1.8). Infatti l'attività di moltissime proteine intracellulari è regolata in funzione della loro acetilazione<sup>66</sup>.

L'attività e la stabilità di molte proteine sono determinate dai livelli di acetilazione dei residui di lisina. Ad esempio, l'acetilazione e l'ubiquitilazione avvengono a livello degli stessi residui amminoacidici e spesso la competizione tra queste due modifiche post-traduzionali influenza la stabilità dei substrati e la loro attività<sup>68</sup>. Pertanto, gli HDAC possono determinare la degradazione di molti substrati determinando l'esposizione dei residui di lisina per l'ubiquitilazione.

Gli HDAC influenzano anche le interazioni proteina-proteina come nel caso del fattore trascrizionale STAT3. Attraverso la stimolazione da parte di citochine, STAT3 viene attivato e acetilato prima di omodimerizzare e traslocare nel nucleo. Pertanto, la deacetilazione mediata dagli HDAC impedisce la dimerizzazione e la successiva traslocazione nel nucleo<sup>69,70</sup>. La deacetilazione del fattore HIF1, espresso nella cellula in risposta a cambiamenti di ossigeno disponibili e all'angiogenesi, invece, impedisce l'associazione con il complesso VHL, la sua ubiquitilazione e la conseguente degradazione nel proteasoma<sup>71</sup>. Un altro processo regolato dall'attività degli HAT/HDAC è rappresentato dall'interazione tra la proteina Ku-70 e la proteina pro-apoptotica BAX<sup>72</sup>. Ku-70 è la principale molecola indotta in risposta ad un danno al DNA ed è in grado di sequestrare BAX dal mitocondrio, proteggendo la cellula dall'apoptosi. Quando la cellula subisce un forte stress, l'aumento di acetilazione di Ku-70 determina il distacco di BAX e la successiva traslocazione nel mitocondrio dove viene attivato il processo di apoptosi.

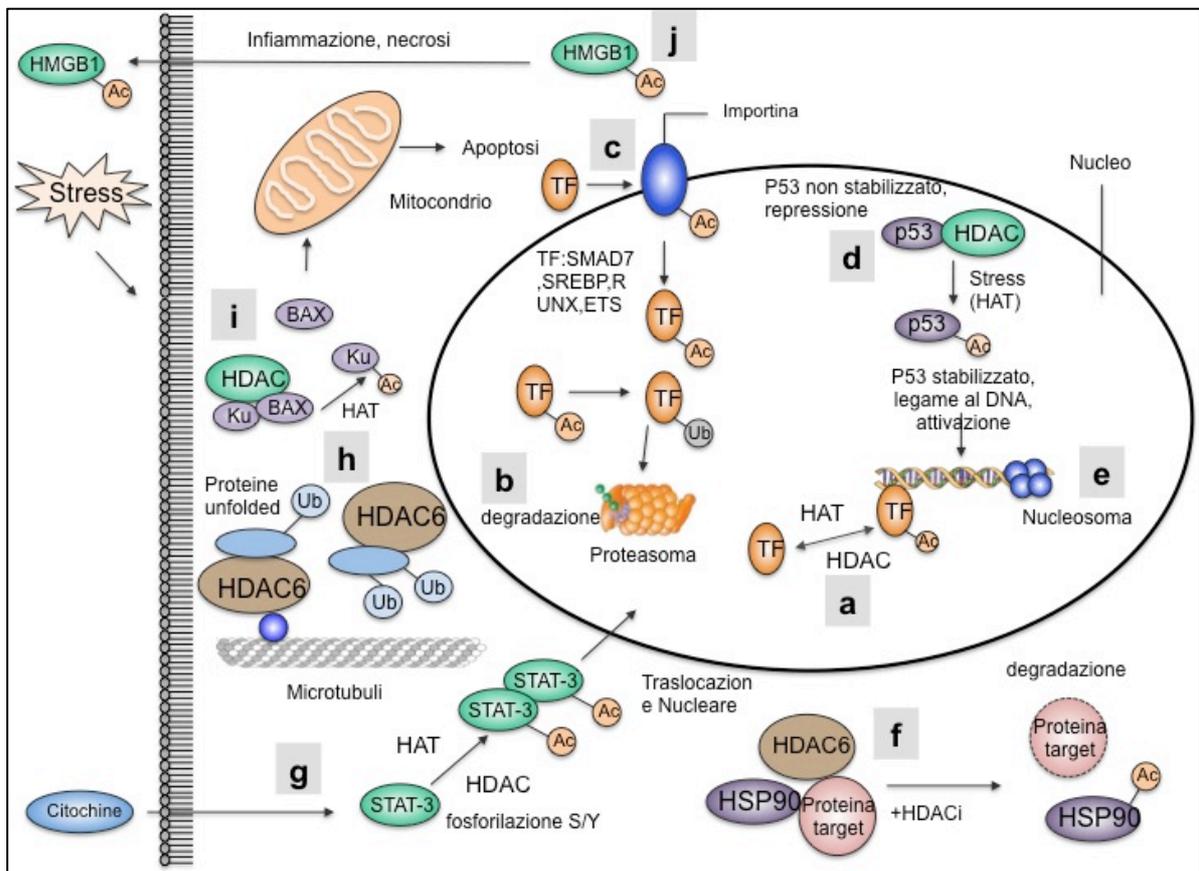
E' stato più volte dimostrato che l'acetilazione influenza la localizzazione sub-cellulare di alcuni fattori, come ad esempio STAT3 o BAX. Nel caso della proteina HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*), l'acetilazione favorisce la sua esportazione dal nucleo e l'accumulo nel citoplasma prima di essere secreta nell'ambiente extra-cellulare durante il processo infiammatorio o di necrosi<sup>73</sup>.

Inoltre, gli HDAC mediano la deacetilazione di fattori di trascrizione come p53 o NF- $\kappa$ B<sup>74,75</sup>. Nel caso della proteina p53, la stabilità così come l'attività trascrizionale e l'interazione con il DNA dipende strettamente dalla sua acetilazione<sup>74</sup>. In maniera simile anche il fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B subisce la regolazione degli HAT/HDAC. Infatti, la sua acetilazione influenza la sua attività trascrizionale e la sua capacità di interagire con il suo inibitore, I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>75</sup>.

In particolare, l'HDAC6 ricopre un ruolo cruciale per la formazione degli *aggresome*, organelli deputati alla degradazione delle proteine citoplasmatiche *unfolded* e tossiche, anche se, in questo caso, il ruolo dell'acetilazione è ancora da chiarire<sup>76</sup>. Recentemente, l'HDAC6 ha dimostrato di possedere la capacità di deacetilare la *chaperone* citoplasmatica HSP90, che controlla la stabilità di molte oncoproteine.

Pertanto, gli HDAC risultano coinvolti in molteplici processi cellulari che comprendono la proliferazione cellulare, la migrazione, l'angiogenesi, la stabilità di proteine, le interazioni proteina-proteina e le localizzazioni sub-cellulari delle diverse molecole proteiche.

L'identificazione di substrati non-istonici, determina un forte coinvolgimento degli HDAC nel processo di tumorigenesi e di progressione tumorale.



**Fig. 1.8 Processi biologici regolati dall'acetilazione**

L'acetilazione (Ac) può regolare il legame di fattori di trascrizione (TF) sul DNA (a). Gli HDAC/HAT influenzano la stabilità di molte proteine intracellulari (b). L'ingresso o l'uscita di proteine dal nucleo è regolato dall'acetilazione delle proteine deputate al trasporto a livello della membrana nucleare (c). L'attività di p53 è strettamente influenzata dall'acetilazione (d) così come l'accessibilità del nucleosoma è un processo regolato dall'attività degli HAT e HDAC (e). L'attività della *chaperone* HSP90 è influenzata dall'acetilazione. L'acetilazione di HSP90 in assenza di HDAC6 previene l'interazione di HSP90 con le proteine target (f). L'acetilazione di fattori di trascrizione come STAT3 determina la dimerizzazione della proteina e la traslocazione nel nucleo (g). La funzionalità dell'*aggressome* è regolata dall'acetilazione. L'HDAC6 è indispensabile per reclutare le proteine ubiquitilate a livello dell'*aggressome*. L'inibizione dell'attività dell'HDAC6 porta ad un accumulo di proteine che risulta tossico (h). La traslocazione di BAX nel mitocondrio è influenzata dall'acetilazione della proteina Ku-70, indotta in seguito ad un danno al DNA. Quando Ku-70 è acetilata, BAX è libero ed è localizzato nel mitocondrio (i). L'acetilazione favorisce anche la traslocazione di HMGB1 nel citoplasma e la secrezione nell'ambiente extra-cellulare.

### 1.3.2 HDAC COME BERSAGLI DI TERAPIA NELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE

Per molto tempo il cancro è stato considerato come il risultato di una serie di mutazioni a carico del DNA che determinano l'attivazione di oncogeni e l'inattivazione di geni oncosoppressori. In realtà, oltre alle modificazioni della sequenza, anche le modificazioni epigenetiche del DNA giocano un ruolo cruciale nello sviluppo del tumore. Molto spesso nel cancro si osserva una progressiva alterazione dei processi di regolazione epigenetica che determinano una deregolazione della trascrizione genica e contribuiscono al processo neoplastico. Più in generale, le cellule tumorali sono caratterizzate da uno stato di ipoacetilazione che rappresenta il risultato di uno sbilanciamento dell'equilibrio tra l'attività degli HAT e degli HDAC. Un'attività deregolata di questi enzimi, ed una conseguente alterazione dell'espressione genica, è stata osservata in particolar modo nelle neoplasie ematologiche. A differenza degli HAT, che spesso sono soggetti a mutazioni o amplificazioni, i geni che codificano per gli HDAC subiscono raramente mutazioni a carico della sequenza genica. Più frequentemente, l'attività aberrante degli HDAC è determinata dal reclutamento da parte di proteine di fusione generate in seguito a traslocazioni cromosomiche<sup>65-67</sup>.

Il primo esempio di attività aberrante degli HDAC è rappresentato dalla leucemia promielocitica acuta<sup>77</sup>. Questa forma di leucemia, caratterizzata da un arresto delle cellule leucemiche ad uno stadio di promielociti, è determinata dalle traslocazioni genetiche t(15;17) nel 95% dei casi e t(15;17) nel restante 5%. Le proteine di fusione PML-RAR o PLZF-RAR, generate dalle traslocazioni geniche, agiscono come repressori trascrizionali attraverso il reclutamento di HDAC a livello delle regioni promotrici dei geni target<sup>77</sup>. In condizioni fisiologiche la proteina RAR, recettore dell'acido retinoico che ricopre un ruolo centrale nel differenziamento mieloide, dimerizza con la proteina RXR, recettore per il retinoide. Il complesso funziona come un repressore trascrizionale che lega specifiche sequenze sul DNA (RARE) reclutando gli enzimi HDAC<sup>77</sup>. I livelli fisiologici di acido retinoico sono in grado di determinare un cambiamento conformazionale che determina il rilascio degli HDAC e la conseguente trascrizione dei geni target importanti per il differenziamento. Diversamente, nella leucemia promielocitica acuta le proteine di fusione sono insensibili ai livelli fisiologici di acido retinoico e determinano una costante repressione trascrizionale dei geni RARE. La somministrazione di acido retinoico a dosi farmacologiche (10-100 volte maggiori rispetto a quelle fisiologiche) in combinazione con HDAC inibitori è in grado di bloccare il reclutamento degli HDAC e determina il differenziamento terminale delle cellule tumorali con entrambe le proteine di fusione confermando il ruolo centrale degli HDAC nello sviluppo della leucemia<sup>78</sup>. Un altro esempio è la leucemia mieloide acuta in cui l'aberrante repressione trascrizionale mediata degli HDAC è implicata nei meccanismi responsabili di sviluppo della neoplasia. La

caratteristica biomolecolare di questa leucemia è rappresentata dalla proteina di fusione AML1-ETO come conseguenza della traslocazione genica (t8;21). AML1-ETO agisce come potente repressore trascrizionale attraverso l'interazione con la proteina N-Cor e la formazione del complesso N-Cor/Sin3/HDAC<sup>79</sup>. Più precisamente, AML1, nella normale emopoiesi è un attivatore trascrizionale, mentre quando è fuso con la proteina ETO diventa un potente repressore determinando il silenziamento dei geni coinvolti nel differenziamento granulocitico. Nel contesto della proteina di fusione, AML1 mantiene la capacità di legare siti specifici a livello del DNA, mentre la proteina ETO funziona da *scaffold* per i complessi co-repressori, incluso il complesso N-Cor, Sin 3 e HDAC<sup>79</sup>. Anche in questo caso gli HDAC hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento del fenotipo neoplastico. Infatti, il reclutamento degli HDAC sembra strettamente indispensabile per garantire il silenziamento genico indotto da AML1-ETO, mentre l'inibizione con HDAC inibitori sembra revertire parzialmente il blocco del differenziamento indotto dalla proteina di fusione supportando l'uso terapeutico di queste molecole in questa patologia.

Il coinvolgimento degli HDAC non è limitato alle neoplasie mieloidi ma si estende anche ai linfomi. L'esempio più importante è rappresentato dai B-NHL e più precisamente, dal DLBCL. In queste neoplasie ematologiche, il meccanismo molecolare che determina la trasformazione neoplastica è l'overespressione della proteina BCL-6 che, attraverso il reclutamento di HDAC di classe I e II, promuove la repressione trascrizionale di molti geni oncosoppressori. L'acetilazione da parte dell'HAT p300 regola negativamente l'attività di BCL-6 impedendo alla proteina di reclutare gli HDAC e di promuovere la trasformazione neoplastica delle cellule<sup>80,81</sup>. E' quindi possibile ipotizzare l'utilizzo di HDAC inibitori per controllare l'attività di BCL-6 sull'espressione genica attraverso la modulazione della sua acetilazione o influenzando l'accessibilità del fattore di trascrizione su specifiche regioni di DNA. Allo stesso modo, nei B-NHL aggressivi, l'espressione aberrante della proteina c-Myc coopera con gli HDAC per promuovere il suo programma trascrizionale e la trasformazione neoplastica<sup>10</sup>. C-Myc rappresenta un valido target di terapia per bloccare la proliferazione delle cellule neoplastiche in quanto è stato dimostrato che la sua inibizione determina il blocco della proliferazione del clone neoplastico<sup>82</sup>. Purtroppo non sono ancora disponibili in clinica dei farmaci in grado di bloccare in modo efficiente la proteina c-Myc. Pertanto, l'idea di abrogare l'attività trascrizionale di c-Myc bloccando gli enzimi HDAC potrebbe rappresentare una strategia alternativa per interrompere la linfomagenesi guidata da c-Myc<sup>82</sup>.

Pertanto, un'alterata attività delle HDAC può avere un ruolo di rilievo nella trasformazione neoplastica, rendendoli target ideali per una possibile terapia antitumorale. La repressione di oncogeni attivati, e soprattutto la ri-espressione di oncosoppressori, indotta dagli HDAC è sufficiente per indurre risposte biologiche significative e promuovere programmi antiproliferativi che determinano l'inibizione della crescita del

tumore. Infatti, al contrario delle mutazioni genetiche, i cambiamenti epigenetici potrebbero essere revertiti farmacologicamente attraverso l'inibizione degli enzimi responsabili dei *pattern* epigenetici alterati.

### 1.3.3 CLASSIFICAZIONE E UTILIZZO CLINICO DEGLI HDAC INIBITORI NEL TRATTAMENTO DEI LINFOMI NON HODGKIN

Dal punto di vista chimico, gli inibitori degli HDAC sono generalmente costituiti da una porzione chelante lo zinco, da un *linker* e da un *cap* che interagisce con l'enzima attraverso interazioni idrofobiche. In base alla struttura chimica è possibile distinguere diverse classi di inibitori degli HDAC: derivati dell'acido idrossamico, benzammidi, acidi grassi a catena corta, tetrapeptidi ciclici e chetoderivati<sup>66</sup>.

La categoria maggiormente studiata è quella dei derivati dell'acido idrossamico. Alcuni dei composti appartenenti a questa classe, tra cui il Vorinostat (SAHA, Zoliza®), il Panobinostat (LBH589), il Belinostat (PXD-101), il PCI-24781 ed il R306465 (JNJ-1621199), sono stati sviluppati in clinica. Il Vorinostat, un pan-inibitore degli HDAC di classe I e II, è stato il primo composto approvato dall'FDA (*Food and Drug Administrator*) nell'Ottobre 2006 per il trattamento del linfoma a cellule T cutaneo ad uno stadio avanzato. Inoltre, studi di fase I e II hanno dimostrato un profilo di sicurezza accettabile e una buona attività del Vorinostat utilizzato come singolo agente anche in pazienti con B-NHL refrattario aggressivo o indolente<sup>83</sup>. Il Panobinostat, invece, è potente inibitore delle classi I, II e IV di HDAC e, come singolo agente, ha mostrato una buona attività antitumorale in pazienti con differenti neoplasie ematologiche. Attualmente, il Panobinostat è studiato in associazione ad altri agenti anti-neoplastici tra cui l'Everolimus (inibitore di mTOR)<sup>84</sup>. Il Belinostat è un altro acido idrossamico in fase di sperimentazione che ha fornito buoni risultati in particolar modo nei linfomi a cellule T periferiche<sup>85</sup>.

La Romidepsina (dispeptide, FK228, Istodax®), inibitore di origine naturale appartenente alla classe dei peptidi ciclici, è stato il secondo inibitore degli HDAC ad essere approvato dall'FDA nel 2009 per il trattamento del linfoma a cellule T cutaneo. Sebbene sia in grado di inibire sia gli HDAC della classe I sia quelli appartenenti alla classe II a concentrazioni nanomolari, la Romidepsina mostra un'attività preferenziale contro gli HDAC di classe I. Pertanto, a differenza del Vorinostat, il dispeptide è considerato un inibitore selettivo<sup>86</sup>. Questa molecola è stata approvata per l'utilizzo clinico sulla base di studi clinici multicentrici che hanno dimostrato un tasso di risposta del 34-35% ed effetti tossici limitati<sup>87</sup>.

La classe di inibitori degli HDAC più semplice a livello strutturale è rappresentata dagli acidi grassi a catena corta ed include l'acido valproico e il fenilbutirrato. Nonostante la limitata attività inibitoria, questi composti sono in fase di valutazione per il trattamento

delle neoplasie ematologiche. L'acido valproico, in origine utilizzato come farmaco anti-epilettico, inibisce gli HDAC di classe I determinando il differenziamento delle cellule neoplastiche<sup>88</sup>. Dati i suoi limitati effetti collaterali, questo composto è stato testato come agente anti-leucemico in differenti trial clinici.

Pertanto, i trial clinici condotti con diverse tipologie di HDAC inibitori per il trattamento delle neoplasie ematologiche hanno dimostrato l'utilità clinica di questi farmaci soprattutto nel linfoma a cellule T cutaneo o a cellule T periferiche, ed un potenziale utilizzo anche in altre tipologie di linfomi.

### 1.3.4 MECCANISMO D'AZIONE DEGLI INIBITORI DEGLI HDAC

Considerato il vasto numero di substrati su cui agiscono gli HDAC ed i processi biologici in cui sono implicati questi enzimi, non sorprende la moltitudine dei meccanismi d'azione degli HDAC inibitori finora identificati (figura 1.9). E' importante ricordare che la risposta all'azione degli HDAC inibitori dipende in parte dal tempo di esposizione, dalla concentrazione e dal tipo di cellula.

- **ARRESTO DEL CICLO CELLULARE:** una caratteristica peculiare degli HDAC inibitori è l'induzione di un blocco del ciclo cellulare in fase G1/S. L'arresto del ciclo cellulare in fase G1 è generalmente determinato dall'induzione della proteina p21, indipendentemente dall'attivazione dell'oncosoppressore p53. Gli HDAC inibitori determinano un aumento di acetilazione degli istoni a livello del promotore di p21 e modulano l'accessibilità a fattori di trascrizione come Sp-1<sup>89</sup>. In assenza di p21, l'arresto in G1 coincide con una diminuzione dei livelli di ciclina A e D e delle corrispettive CDK. Inoltre, la repressione di geni coinvolti nella sintesi del DNA, come l'enzima CTP-sintasi, può contribuire a determinare il blocco del ciclo cellulare<sup>89</sup>. L'arresto in fase G2/M è raro ed è indotto dall'attivazione del G2-phase checkpoint.
- **INDUZIONE DI MORTE CELLULARE:** gli HDAC inibitori possiedono la capacità di riattivare il processo di apoptosi nelle cellule tumorali. L'apoptosi cellulare consiste in due distinti *pathway*: il *pathway* estrinseco che include l'attivazione di recettori di morte ed i loro ligandi, ed il *pathway* intrinseco che ha origine intracellulare. Gli inibitori degli HDAC modulano l'espressione di molte molecole che regolano il processo di apoptosi e, di conseguenza, stimolano l'apoptosi interferendo a molteplici livelli di segnalazione.

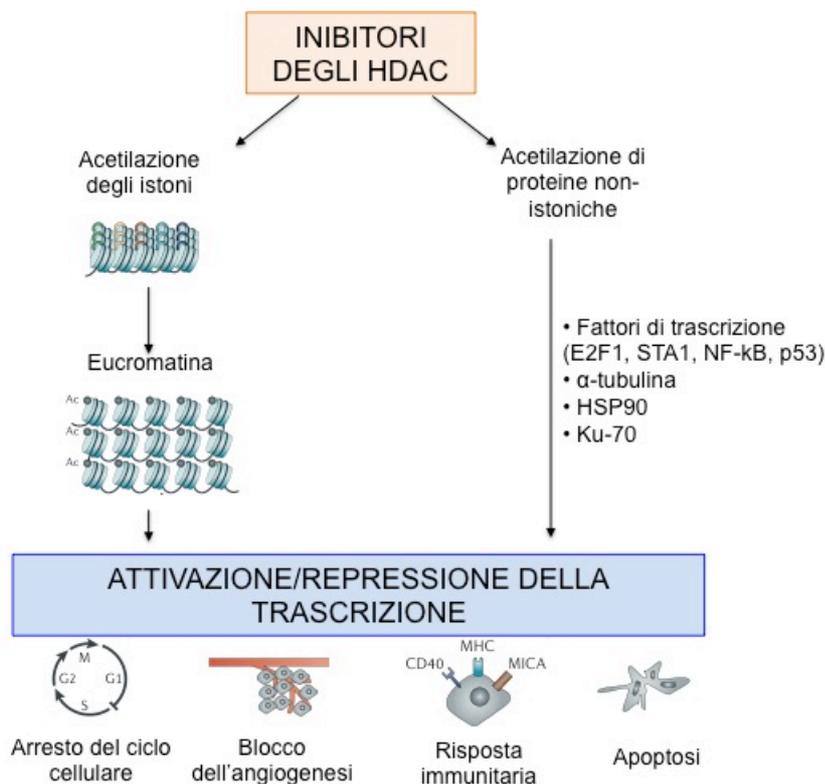
PATHWAY ESTRINSECO: E' stato dimostrato che l'apoptosi mediata dagli inibitori degli HDAC avviene attraverso l'up-regolazione di *death receptor* e dei loro ligandi. Molti inibitori inducono un aumento di espressione di TRAIL-R1/R2, Fas e FasL<sup>90</sup> promuovendo l'aumento di acetilazione a livello delle regioni promotrici e

reclutando fattori di trascrizione come Sp-1 ed Sp-3<sup>90</sup>. I diversi inibitori possono anche modulare il pathway di apoptosi estrinseca a diversi livelli, ad esempio aumentando l'espressione della caspasi 8 e della proteina adattatrice FADD oppure down-modulando la proteina inibitoria c-Flip<sup>91,92</sup>.

PATHWAY INTRINSECO: l'induzione del *pathway* intrinseco avviene principalmente attraverso l'attivazione delle proteine della famiglia *BH3-only*. La famiglia di proteine *BH3-only protein* regola l'attivazione dell'apoptosi intrinseca attraverso la diretta interazione con proteine pro-apoptotiche (Bak e Bax) o anti-apoptotiche (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, MCL1). L'attività delle *BH3-only proteins* può essere regolata a livello trascrizionale e attraverso modifiche post-traduzionali. L'attivazione o la trascrizione delle *BH3-only protein* in risposta agli inibitori degli HDAC sembra essere importante per l'attivazione del pathway intrinseco. Infatti, l'inibizione degli HDAC provoca il clivaggio della proteina Bid e l'attivazione delle proteine *Bim* e *Bmf*. Entrambe le proteine subiscono un'up-regolazione a livello trascrizionale: la proteina *Bmf* è up-regolata attraverso l'aumento dell'acetilazione degli istoni a livello delle regioni promotrici; la proteina *Bim* è attivata attraverso il reclutamento del fattore trascrizionale E2F1 a livello del promotore<sup>93</sup>. Il pathway di apoptosi intrinseco può essere anche attivato in seguito alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'aumento di ROS intracellulari è un evento che spesso si verifica con un trattamento con gli inibitori degli HDAC e precede i cambiamenti a livello del potenziale mitocondriale che determinano la morte cellulare<sup>94</sup>.

- INIBIZIONE DELL'ANGIOGENESI: l'inibizione degli HDAC può inoltre bloccare la crescita cellulare attraverso l'inibizione dell'angiogenesi. Infatti, gli HDAC inibitori sono in grado di aumentare l'acetilazione del fattore pro-angiogenico HIF-1 $\alpha$  determinandone la sua degradazione ed di ridurre l'espressione del fattore VEGF e dell'angiopoietina<sup>95</sup>.
- INIBIZIONE DEL PROCESSO DI METASTATIZZAZIONE: gli inibitori degli HDAC sono in grado di interferire con il processo di metastatizzazione down-regolando il recettore per chemochine CXCR4, importante per l'*homing* dei progenitori midollari e delle cellule endoteliali circolanti, e fattori prometastatici come la metalloproteinasi MMP2. In particolare, attraverso l'inibizione dell'HDAC6, gli inibitori degli HDAC riducono l'acetilazione dei microtubuli impedendo la migrazione delle cellule tumorali<sup>96</sup>.
- EFFETTI SULL'IMMUNITA' ANTITUMORALE: gli inibitori degli HDAC possono modulare l'immunità antitumorale attraverso diversi meccanismi tra cui l'up-regolazione di antigeni tumorali determinando un maggior riconoscimento da parte delle cellule immunitarie e la conseguente lisi delle cellule tumorali da parte delle

cellule T ed NK. L'aumento dell'immunogenicità delle cellule tumorali avviene anche attraverso l'induzione dell'espressione delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e II e di molecole costimolatorie o di adesione come il CD40, il CD80, il CD86<sup>97,98</sup>. Inoltre, l'inibizione degli HDAC genera un'alterata secrezione di citochine sebbene ancora non sia stato chiarito se questo effetto è causato dalla diretta iperacetilazione al livello delle regioni promotrici dei geni per le citochine o se la loro espressione è un effetto secondario. Tuttavia, le proteine STAT1, STAT3 ed NF- $\kappa$ B rappresentano dei fattori trascrizionali che influenzano fortemente le caratteristiche immunogeniche delle cellule e la loro attività è regolata da modifiche post-traduzionali tra cui anche l'acetilazione<sup>66</sup>. Pertanto, l'aumento dei livelli di citochine e l'up-regolazione di molecole immunogeniche sulle cellule tumorali potrebbe essere giustificato dall'aumento dell'acetilazione di queste molecole.



**Fig. 1.9 Effetti bio-molecolari associati all'attività degli inibitori degli HDAC.**

Oltre a regolare lo stato di acetilazione degli istoni, gli HDAC possono deacetilare e regolare l'attività di molte altre proteine, inclusi fattori trascrizionali e proteine coinvolte in altre funzioni biologiche. Gli effetti antitumorali degli HDAC inibitori colpiscono la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali attraverso molteplici meccanismi biologici. Gli HDACi inducono l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub>/S attraverso l'aumento della trascrizione di p21 o la repressione delle cicline. Possono inibire l'angiogenesi riducendo l'espressione di fattori pro-angiogenetici, come VEGF o HIF1 $\alpha$ . Gli HDAC inibitori possono anche avere effetti immunomodulanti aumentando l'antigenicità della cellula tumorale e alterando l'espressione di una serie di citochine.

L'elevata sensibilità delle cellule cancerose rispetto alle cellule sane dimostra che gli HDAC inibitori presentano una forte selettività d'azione nei confronti delle cellule neoplastiche. Questi inibitori possono uccidere anche cellule tumorali non proliferanti, risparmiando le cellule normali e conferendo un significativo vantaggio rispetto agli agenti anti-tumorali convenzionali che sono diretti selettivamente contro cellule proliferanti<sup>66</sup>. Queste differenze in termini di sensibilità possono dipendere dalla dipendenza delle cellule tumorali a determinati pathway intracellulari, da anomalie genetiche o dall'incapacità delle cellule trasformate di attivare vie di segnalazione in grado di stimolare segnali di sopravvivenza in seguito ad un insulto tossico.

# **SCOPO DELLA RICERCA**

La proteina c-Myc ricopre un ruolo fondamentale nella regolazione di molte funzioni cellulari. Reclutando complessi contenenti enzimi che rimodellano la cromatina, c-Myc influenza l'espressione genica attivando o reprimendo i suoi geni target<sup>10-12</sup>. C-Myc regola circa il 15% dei geni cellulari coinvolti nel metabolismo, nella crescita, nella proliferazione e nel differenziamento cellulare<sup>9</sup>. Inoltre, ad aumentare la complessità di c-Myc, si aggiunge anche la capacità di modulare un vasto numero di microRNA che contribuiscono a promuovere all'interno della cellula segnali di sopravvivenza e proliferazione<sup>28</sup>.

L'espressione deregolata del fattore di trascrizione c-Myc gioca un ruolo cruciale nelle patogenesi e nella progressione dei NHL di tipo B<sup>1</sup>. Il primo esempio di oncogenesi guidata da c-Myc è rappresentato dal BL, un linfoma aggressivo in cui l'evento oncogenico primario è costituito dalla traslocazione genica del proto-oncogene c-Myc sotto le regioni promotrici delle catene pesanti o leggere delle Ig<sup>4</sup>. Le aberrazioni genetiche che coinvolgono il locus di c-Myc, come ad esempio traslocazioni o amplificazioni, o la sua iperespressione in seguito a modifiche post-traduzionali della proteina possono contribuire anche allo sviluppo dei linfomi DLBCL e predirne una prognosi non favorevole<sup>6,51</sup>. Nei BL la prognosi è stata significativamente migliorata dall'introduzione di regimi chemioterapici intensivi utilizzati in ambiente pediatrico ma l'applicazione di queste terapie in pazienti adulti è legata a tossicità che determina ritardo nell'esecuzione della terapia con conseguente riduzione dell'intensità di dose<sup>4</sup>. Pertanto, per il BL, la tossicità associata al trattamento e le ricadute frequenti rappresentano ancora un grosso ostacolo per la cura dei pazienti. Per quanto riguarda i DLBCL c-Myc positivi, invece, i trattamenti disponibili hanno scarsa efficacia e mostrano tassi di risposte inferiori a quelli dei DLBCL c-Myc negativi<sup>6,51</sup>. Pertanto, la ricerca di nuovi farmaci con un meccanismo d'azione innovativo da soli o in combinazione con la chemioterapia convenzionale rappresenta una necessità clinica per il trattamento dei B-NHL c-Myc positivi.

C-Myc rappresenta un bersaglio terapeutico fondamentale per inibire la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule linfomatose in considerazione della stretta correlazione tra la deregolazione di c-Myc e la linfomagenesi<sup>1</sup>. Interferire con l'espressione di c-Myc potrebbe consentire un miglioramento della prognosi dei pazienti. Purtroppo, la presenza di più domini funzionali rende difficilmente perseguibile con un singolo farmaco il blocco selettivo delle funzioni oncogeniche di c-Myc.

Date le molteplici evidenze a sostegno della capacità di c-Myc di promuovere il suo programma trascrizionale interagendo con regolatori epigenetici, tra cui gli HDAC, gli inibitori degli enzimi HDAC potrebbero contribuire a revertire il fenotipo neoplastico indotto dall'overespressione di c-Myc.

Pertanto, lo scopo del progetto è stato quello di caratterizzare in modelli preclinici di NHL a cellule B aggressivi c-Myc positivi l'attività antitumorale del nuovo pan-inibitore degli HDAC ITF2357 (Givinostat®) come singolo trattamento o in associazione ad agenti antineoplastici convenzionali al fine di fornire il razionale necessario per l'utilizzo in clinica di questo farmaco.

# **MATERIALI E METODI**

### 3.1 FARMACI

ITF2357 (dietil-6-4(idrossicarbamoil-fenil-carbamoilissimetil)-2-il metil) ammonio cloruro monoidrato proviene dall'Italfarmaco (Milano, Italia). Ciclofosfamide (CTX) è stata acquistata dalla Baxter (Endoxan, Baxter).

### 3.2 LINEE CELLULARI E CONDIZIONI DI COLTURA

Per questo progetto sono state utilizzate le seguenti linee cellulari stabilizzate da tumori umani e acquistate dalla *German Collection of Microorganism and Cell Cultures* DMSZ (Braunschweig, Germany, EU):

- RAJI               Linfoma di Burkitt
- NAMALWA       Linfoma di Burkitt
- DOHH-2         Linfoma follicolare
- SU-DHL-4       Linfoma diffuso a grandi cellule

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in coltura in terreno RPMI 1640 (Lonza, Basel, Svizzera) addizionato del 10% di FBS (siero bovino fetale, Lonza) inattivato, dell'1% di L-glutammina (Lonza) e dell'1% di HEPES buffer (Lonza). Le linee sono state coltivate in un incubatore termostato a 37°C con 80% di umidità, ad una concentrazione di CO<sub>2</sub> del 5% e sono state testate periodicamente per l'assenza di contaminazione da micoplasma con il *MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* (Lonza). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando le cellule in fase di crescita esponenziale. Per la valutazione dell'attività antiproliferativa di ITF2357 le cellule sono state seminate in fiasche sterili apirogene (Costar, Corning Incorporated, New York, USA) ad una concentrazione pari a  $0,3 \times 10^6$  cellule/ml. Le linee cellulari sono state trattate con ITF2357 ad una concentrazione pari a 0,2 µM una singola volta o quotidianamente. Al termine dei trattamenti le cellule sono state raccolte, centrifugate e risospese in un adeguato volume di DPBS per la conta al microscopio. Per discriminare le cellule vive dalle cellule morte è stato utilizzato il colorante vitale *Tripin Blue* (Sigma-Aldrich).

### 3.3 ANALISI CITOFLUORIMETRICHE

#### 3.3.1 Valutazione citofluorimetrica dell'espressione di c-Myc

L'espressione della proteina c-Myc nelle linee di linfoma è stata valutata mediante analisi al citofluorimetro. A tale scopo,  $10^6$  cellule di ciascuna linea di linfoma sono state lavate con di soluzione di lavaggio (DPBS al 2% di FBS) e permeabilizzate con il kit *Fixation and permeabilization* (eBioScience, San Diego, CA, USA). Dopo la fissazione, le cellule sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-c-Myc (1:100 Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) e incubate per 30 minuti a 4°C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate con un tampone di lavaggio (eBioscience) e incubate per 30 minuti a 4°C

in presenza di un anticorpo secondario anti-mouse coniugato al fluorocromo FITC (1:100 KPL, Gaithersburg, MD, USA). I campioni sono stati risospesi in 200  $\mu$ l di soluzione di lavaggio e acquisiti al citofluorimetro (FACSCalibur, Becton Dickinson). La percentuale delle cellule positive e l'intensità di fluorescenza media nel canale FL-1 di ciascun campione è stata calcolata mediante il software FlowJo (TreeStar).

### **3.3.2 Valutazione della quota di apoptosi mediante marcatura con Annessina-V/Ioduro di Propidio**

Durante l'apoptosi la cellula subisce la traslocazione del fosfolipide di membrana Fosfatidil-Serina (PS) dal lato interno della membrana, dove normalmente è localizzato, a quello esterno. L'Annessina V è una proteina che si lega in modo Ca-dipendente con elevata affinità e specificità alla Fosfatidil-Serina. E' possibile quindi utilizzare l'Annessina V marcata con un fluoroforo (nel nostro caso FITC) come sonda sensibile per rilevare l'esposizione della Fosfatidil-Serina sulla superficie cellulare ed individuare la frazione di cellule in apoptosi all'interno della popolazione totale. Anche nelle cellule in necrosi la Fosfatidil-Serina è accessibile alla marcatura a causa della perdita d'integrità della membrana plasmatica; tuttavia la colorazione con Ioduro di Propidio (PI) permette di distinguere le cellule necrotiche da quelle apoptotiche. Infatti il PI è un colorante che si lega al DNA ed è in grado di penetrare all'interno delle cellule solo quando la loro membrana citoplasmatica è danneggiata. Di conseguenza mentre le cellule necrotiche risultano positive alla colorazione con PI a causa dei danni subiti alla membrana cellulare, le cellule in apoptosi, la cui membrana è ancora integra, risulteranno negative. Quindi grazie alla combinazione di Annessina V e PI è possibile ottenere un profilo citofluorimetrico dove le cellule vitali risultano negative ad entrambi i marcatori, quelle in apoptosi risultano positive all'Annessina V e negative al PI mentre quelle necrotiche sono positive per entrambi i marcatori. Per la valutazione della quota di apoptosi è stato utilizzato il kit *Annexina-V/FITC Detection* (Immunostep, Salamanca, Espania). 200.000 cellule per ogni condizione di trattamento sono state lavate con 2 ml di *Binding Buffer* (tampone specifico a base di calcio: 0,1M Hepes/NaOH, pH7.4, 1,4M NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>) diluito 1:10 con acqua distillata e risospese in un volume pari a 195  $\mu$ l di Binding buffer a cui sono stati aggiunti 5  $\mu$ l di Annessina V-FITC. Dopo un'incubazione di 15 minuti al buio a temperatura ambiente, le cellule sono state lavate e risospese in 200 $\mu$ l di tampone per la lettura. Al momento dell'acquisizione al citofluorimetro (FACS Calibur, Becton Dickinson) sono stati aggiunti 10 $\mu$ l di Ioduro di Propidio 20 $\mu$ g/ml. I campioni sono stati acquisiti settando i fotomoltiplicatori sull'autofluorescenza del campione di controllo. Al momento dell'acquisizione, in tutti i citogrammi relativi ai parametri fisici (FSC ed SSC) sono stati esclusi i detriti cellulari. Per ogni campione sono stati acquisiti 20.000 eventi ed è stata valutata l'intensità di fluorescenza nei canali FL1 (FITC) ed FL3 (PI). Il totale delle cellule apoptotiche è stato calcolato come somma degli eventi, esclusa la percentuale di cellule

annexina V/PI, utilizzando il software BD CellQuest™Pro (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). I dati sono stati analizzati con il software Flow-Jo per Macintosh Pro (Tree Star, Inc. Ashland, OR)

### ***3.3.3 Analisi della perturbazione del ciclo cellulare***

Per analizzare la distribuzione della popolazione cellulare nelle diverse fasi del ciclo cellulare, è stato utilizzato il metodo di colorazione del DNA basato sull'utilizzo del colorante fluorescente Ioduro di Propidio. A seconda della fase del ciclo cellulare, G1/G0, S o G2/M, in cui la cellula si trova, il contenuto di DNA all'interno del nucleo cambia. In fase G1, il corredo cromosomico è diploide; in fase S, durante la quale avviene la replicazione del DNA, la quantità di DNA aumenta in modo continuo, fino a raddoppiare in fase G2/M. Pertanto, calcolando la quantità di DNA presente nelle cellule, è possibile discriminare tra le cellule che ciclano tra le varie fasi del ciclo e le cellule che hanno subito un blocco proliferativo in una delle fasi del ciclo cellulare e che, quindi, non sono più in grado di dividersi e replicare. Il PI è un fluorocromo intercalante del DNA, appartenente alla famiglia dei fenantridinici le cui molecole presentano la caratteristica di non essere fluorescenti quando sono libere nel solvente, mentre sviluppano un'elevata efficienza quantica quando si trovano intercalati nella doppia elica del DNA. Dato che PI non è in grado di penetrare la membrana cellulare intatta, è necessario permeabilizzare le cellule, fissandole con etanolo 96%. Per ogni campione sono state raccolte dai 3 ai 6 milioni di cellule che sono state lavate in DPBS freddo per rimuovere completamente il terreno di coltura. Il surnatante è stato aspirato e le cellule sono state fissate in etanolo 96% freddo (conservato a -20°C) e soluzione salina GM fredda (glucosio 1,1 g/l, NaCl 8 g/l, KCl 0,4 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,2 g/l (0,39 g/l\*12 H<sub>2</sub>O), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 g/l, EDTA 0,2 g/l (0,5mM), Lonza): l'etanolo è in grado di permeabilizzare e fissare le cellule, mentre, l'EDTA contenuto nella salina è in grado di chelare gli ioni Mg<sup>2+</sup>, cofattori essenziali per gli enzimi DNAasi che vengono così inibiti, preservando l'integrità del DNA. Infine, 3x10<sup>6</sup> cellule sono state risospese in 1 ml di salina e 3 ml di etanolo 96%, aggiunto goccia a goccia in agitazione su un vortex per evitare la formazione di aggregati cellulari. Le cellule così fissate sono state conservate a 4°C per 24 ore. Il giorno successivo è stato possibile colorare con il PI i campioni precedentemente fissati. Dopo due lavaggi con DPBS (Lonza) per eliminare l'etanolo in eccesso, i campioni sono stati risospesi in 1 ml per ogni 10<sup>6</sup> cellule di una soluzione di DPBS al 2% FBS, addizionata di PI, alla concentrazione di 5µg/ml, e 25µl per ml di RNAasi (1mg/ml) ed incubati 24 ore 4°C. I campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro a flusso FACS Calibur (Becton Dickinson) utilizzando il software Cell Quest (Becton Dickinson). L'analisi dei dati ottenuti e della distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata effettuata tramite il programma Flowjo per Macintosh Pro (Tree Star).

### 3.4 REAL-TIME PCR (RT-PCR)

L'estrazione dell'mRNA totali dalle cellule e dei noduli tumorali prelevati dall'esperimento *in vivo*, è stata svolta utilizzando il reagente *Trizol* (Invitrogen) secondo il relativo protocollo. Le cellule sono state raccolte, lavate con il PBS e risospese in *Trizol*. La fase successiva di estrazione è stata eseguita aggiungendo cloroformio ad ogni campione. Dopo essere stato centrifugato, il surnatante è stato eliminato ed al campione è stato aggiunto isopropanolo. I campioni sono stati centrifugati per far precipitare l'RNA. Dopo ripetuti lavaggi con etanolo 75%, i campioni sono stati portati a secco e successivamente risospesi in H<sub>2</sub>O (priva di RNAasi e DNAasi). La concentrazione dell'RNA estratto è stata determinata misurando l'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 260 nm. Dal valore d'intensità ottica è possibile ricavare la concentrazione dell'RNA secondo la formula  $1 \text{ OD} = 40 \mu\text{g}$  di RNA. La qualità dell'RNA totale estratto è stata valutata sia analizzando il rapporto di assorbanza dei campioni alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm, per valutare la contaminazione da proteine, sia con una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%.

Successivamente, per la quantificazione dell'mRNA di c-Myc, 2 $\mu\text{g}$  di RNA totale estratto sono stati retrotrascritti in cDNA secondo il protocollo del kit *Super-script III reagent* (Invitrogen) in presenza di 50  $\mu\text{M}$  di Oligo (dt) *primers*. I livelli di trascritto relativi a c-Myc sono stati normalizzati sull'mRNA di una proteina housekeeping (GAPDH) mediante l'utilizzo di un appropriata *TaqMan probe* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Per la quantificazione dei microRNA miR-26a e Let7a, 200 ng di RNA totale è stato retrotrascritto con il kit *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA) secondo il protocollo indicato. L'espressione dei microRNA è stata normalizzata sul contenuto di RNA U6.

Per tutte le reazioni RT è stato usato il termociclatore *GeneAmp PCR 9700* (Applied Biosystems). I livelli di espressione dei geni sono stati quantificati attraverso l'*ABI Prism 7900HT Sequence detection system* (Applied Biosystems). Le RT-PCR sono state effettuate in triplicato e l'espressione relativa è stata calcolata secondo il metodo del  $2^{(-\Delta\text{Ct})}$ .

### 3.5 ANALISI WESTERN BLOT

#### 3.5.1 Estrazione delle proteine totali

Per la preparazione degli estratti proteici totali, le cellule sono state raccolte a intervalli di 24 ore dal trattamento e lavate DPBS freddo per eliminare completamente il terreno di coltura. Successivamente il *pellet* cellulare è stato risospeso in un tampone di lisi Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, EGTA 1mM, NP-40 1%, Sodio pirofosfato 2.5 mM, Sodio deossicolato 1%,  $\beta$ -glicerofosfato 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, Leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  PMSF 1mM. Al termine dell'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, i campioni sono stati centrifugati a freddo ed il surnatante è stato recuperato e trasferito in eppendorf sterile.

### **3.5.2 Estrazione delle proteine istoniche**

Per la valutazione delle proteine istoniche i pellet cellulari sono stati risospesi in DPBS 2mM PMSF, contenente Triton X 100 allo 0,5% (volume/volume) e NaN allo 0,02% (volume/volume) ed incubati in ghiaccio per 10 minuti. Dopo aver centrifugato i campioni a freddo, i *pellet* nucleari sono stati lavati tampone di lisi, risospesi in una soluzione di HCl allo 0,2 N e incubati a 4 gradi per una notte. La mattina seguente, i campioni sono stati centrifugati a freddo e le proteine istoniche sono state recuperate nel surnatante.

### **3.5.3 Quantificazione degli estratti proteici secondo il metodo di Bradford**

Il metodo di Bradford si basa sull'utilizzo di un colorante che, in ambiente acido, si lega ai residui aminoacidici carichi delle proteine. In queste condizioni, il picco di assorbanza del colorante passa da 465 nm a 595 nm. Per determinare la concentrazione proteica dei campioni è stata allestita una retta di taratura utilizzando come standard una scala di concentrazioni note dell'albumina di siero bovino (BSA). A tutti i campioni è stato aggiunto 1 ml di colorante *Coomassie Brilliant Blue* (BioRad) diluito 1:4 con acqua ed è stata effettuata un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente. I valori di assorbanza sono stati determinati mediante lettura con uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Utilizzando la retta di taratura è stato poi possibile risalire alla concentrazione proteica dei campioni espressa  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### **3.5.5 Elettroforesi, trasferimento e marcatura con anticorpi**

Per la separazione elettroforetica delle proteine in condizioni riducenti sono stati usati gel di acrilammide a gradiente 4-15% (Precast gel, BioRad) ed un tampone di corsa Tris-Glicina al 10% di sodio dodecil solfato (SDS), un detergente con carica netta negativa in grado di legare e mascherare le cariche positive delle proteine. In questo modo, è stato possibile separare le proteine in base al loro peso molecolare. Per la corsa elettroforetica le proteine (30 $\mu\text{g}$  per gli estratti proteici totali e 10 $\mu\text{g}$  per gli estratti proteici acidi) sono state risospese in 20  $\mu\text{l}$  di buffer di caricamento (*Loading Buffer*, Invitrogen, Carlsbad, CA) in presenza di un agente riducente (DTT, Invitrogen, Carlsbad, CA) e sono state denaturate mediante bollitura a 96°C per 5 minuti. I campioni sono stati poi caricati sul gel in un apparato per elettroforesi verticale insieme ad una miscela di proteine a peso molecolare noto (*Dual color marker*, BioRad). La corsa elettroforetica è stata condotta per circa due ore ad un voltaggio costante di 100V. Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Hybond-C Super, GE Healthcare) utilizzando un buffer di trasferimento al 20% di metanolo (G-Biosciences, St. Louis, MO, USA). Successivamente la membrana è stata colorata con *Ponceau S Solution* (Sigma-Aldrich), per verificare l'efficienza del trasferimento, e lavata abbondantemente con soluzione *Tris Buffer Saline Tween 20* (TBS-T) (0.1 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl e 0.1% Tween 20) per eliminare la

colorazione di *Ponceau*. Per mascherare i siti aspecifici, la membrana è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente in una soluzione di saturazione contenente l'1% di BSA (Sigma) e il 3% di ovalbumina (Sigma). In seguito, la membrana è stata incubata una notte a 4°C con l'anticorpo primario diluito opportunamente in soluzione di saturazione.

ANTICORPO PRIMARIO	DITTA	DILUIZIONE (V:V)	SPECIE
c-Myc	Cell Signaling	1:1000	rabbit
p21	Santa Cruz	1:1000	mouse
p27	Santa Cruz	1:1000	mouse
fosfo-p53 (Ser 15)	Dako	1:1000	mouse
acetil-p53	Sigma-Aldrich	1:3000	rabbit
p53	Dako	1:1000	mouse
acetil- $\alpha$ tubulin(Lys40)	Sigma-Aldrich	1:3000	mouse
$\alpha$ tubulin	Invitrogen	1:2000	mouse
acetil-istone H3 (Lys9)	Cell Signaling	1:1000	rabbit
istone H3	Cell Signaling	1:1000	rabbit
acetyl-istone H4	Cell Signaling	1:1000	rabbit
H4	Ab-cam	1:1000	rabbit
PARP	BD Bioscience	1:1000	mouse
fosfo-4EBP1	Santa Cruz	1:300	goat
4EBP1	Cell Signaling	1:1000	rabbit
fosfo-eIF4E (Ser209)	Cell Signaling	1:1000	rabbit
eIF4E	Cell Signaling	1:1000	rabbit
fosfo-eIF4G (Ser1108)	Cell Signaling	1:1000	rabbit
eIF4G	Cell Signaling	1:1000	rabbit
fosfo-Akt (Thr308)	Cell Signaling	1:1000	rabbit
Akt	Cell Signaling	1:1000	rabbit
PIM1	Cell Signaling	1:1000	rabbit
PIM2	Cell Signaling	1:1000	rabbit
PIM3	Cell Signaling	1:1000	rabbit
vinculina	Sigma-Aldrich	1:1000	mouse
actina	Sigma-Aldrich	1:1000	rabbit

In seguito ad abbondanti lavaggi per rimuovere l'eccesso di anticorpo che non ha reagito, la membrana è stata incubata per un'ora con l'anticorpo secondario ant-IgG diretto contro l'anticorpo primario coniugato con perossidasi di rafano [HRP (Amersham Biosciences Milano, I.)]. Dopo l'incubazione con gli anticorpi, le membrane sono state lavate per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario e l'immunoreattività è stata rilevata tramite l'utilizzo del sistema ECL o ECL plus (ECL *Western Blotting Detection Reagents*; GE Healthcare). L'analisi densitometrica delle bande ottenute è stata calcolata mediante il software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>), ogni banda è stata normalizzata sulla propria vinculina o actina.

### 3.7 MODELLO SPERIMENTALE IN VIVO

#### 3.6.1 Xenotrapianto e trattamento di tumori linfoidi umani in topi SCID

Le proprietà antitumorali dell'inibitore degli enzimi iston-deacetilasi IT2357 sono state valutate in vivo come trattamento singolo o in combinazione con ciclofosfamide (CTX, Baxter), chemioterapico convenzionale. Per gli esperimenti di attività in vivo sono stati utilizzati topi con immunodeficienza severa combinata (SCID) di 6-8 settimane dal peso di 20-25 grammi acquistati da *Charles River Laboratoires* (Milano, Italia). Per la generazione delle masse tumorali sottocutanee,  $10^7$  cellule Raji o Namalwa sono state risospese in 200  $\mu$ l di PBS ed inoculate per via sottocutanea nel fianco destro di ciascun topo. Quando i noduli tumorali sottocutanei hanno raggiunto una dimensione media di circa 120 mm<sup>3</sup>, i topi sono stati divisi in maniera casuale in 5 gruppi (7 topi per gruppo nel caso delle cellule Namalwa, 8 topi nel caso della linea Raji) e trattati come descritto di seguito:

- Gruppo 1: animali di controllo reinfusi con soluzione salina allo 0.9% di NaCl
- Gruppo 2: animali trattati con ITF2357 50 mg/kg
- Gruppo 3: animali trattati con CTX 50 mg/kg
- Gruppo 4: animali trattati con CTX 75 mg/kg
- Gruppo 5: animali trattati con ITF2357 50mg/kg in combinazione con CTX 50 mg/kg

ITF2357 è stato risospeso in dimetil sulfossido, PBS e cremofor in rapporto 10:5:85 ed è stato somministrato per via orale tutti i giorni. La CTX è stata disciolta in soluzione salina e somministrata per via endovenosa una volta alla settimana.

I topi sono stati controllati con frequenza giornaliera per la misurazione del peso corporeo e per monitorare l'eventuale comparsa di tossicità. Il volume dei tumori è stato misurato con l'ausilio di appositi calibri ed il loro peso è stato calcolato applicando la seguente formula:  $(a \times b^2)/2$ , dove a e b rappresentano rispettivamente il diametro maggiore ed inferiore. Ogni esperimento è stato effettuato in almeno due occasioni distinte ed utilizzando cinque animali per gruppo di trattamento.

Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato etico per la sperimentazione animale ed eseguiti negli stabulari dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, in accordo con le direttive istituzionali (decreto legislativo N. 116 del 1992, direttiva EU 86/109).

#### 3.6.2 Processamento dei noduli tumorali

Al termine del trattamento, i topi sono stati sacrificati ed i noduli tumorali sono stati escissi. Le masse tumorali sono state disgregate meccanicamente al fine di ottenere una sospensione cellulare. Prima di procedere, è stata controllata la purezza del campione mediante analisi al citofluorimetro (FACS Calibur, Becton Dickinson). Le cellule sono state marcate con anticorpi anti-CD19 (Miltenyi, San Jose, CA, USA) e anti-CD45 (Miltenyi, San Jose, CA, USA)(marcatori di superficie dei linfociti B) per 30 minuti a 4 gradi al buio. I

campioni sono stati acquisiti mediante il programma *Cell Quest* (Becton Dickinson) e la percentuale delle cellule doppie positive per i suddetti marcatori è stata calcolata con il programma di analisi *FlowJo* per Macintosh Pro (Tree Star). Dopo aver confermato la purezza del campione, una parte delle cellule è stata processata per l'analisi biochimica ed una parte per l'analisi dell'mRNA come descritto in precedenza.

### **3.7 ANALISI STATISTICA**

Per l'analisi della distribuzione del ciclo cellulare e della percentuale di apoptosi è stato utilizzato il programma *FlowJo* per Macintosh Pro (Tree Star) che ha permesso l'interpretazione dei dati ottenuti dalle acquisizioni.

Le analisi statistiche sono state effettuate con l'ausilio del programma *Prism 5* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) installato su un personal computer Macintosh Pro (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA). Per rilevare le differenze statistiche tra i campioni trattati e non trattati degli esperimenti *in vitro* è stato utilizzato il test *t* di Student. I dati relativi al volume dei tumori degli esperimenti *in vivo* sono stati analizzati mediante il test statistico *two-way* ANOVA ed i singoli gruppi di trattamento sono stati comparati tra loro mediante il test di Bonferroni.

Per le analisi di correlazione è stato calcolato il coefficiente di Pearson che determina il grado di correlazione tra due variabili.

# RISULTATI

## 4.1 ATTIVITA' ANTITUMORALE DI ITF2357 IN LINEE DI LINFOMA NON-HODGKIN A CELLULE B C-MYC POSITIVE

### 4.1.1 INIBIZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON ITF2357

L'attività antitumorale di ITF2357 è stata testata su 2 linee cellulari di linfoma di Burkitt, Raji e Namalwa, una linea di linfoma follicolare DOHH-2 e una linea di linfoma diffuso a grandi cellule SU-DHL-4. Tutte le linee cellulari utilizzate sono caratterizzate dall'iperpressione dell'oncoproteina c-Myc causata da anomalie cromosomiche che includono la traslocazione del gene di c-Myc sotto il promotore della catena pesante o leggera delle Ig (Namalwa, Raji e DOHH-2) o da mutazioni puntiformi che conferiscono alla proteina maggiore stabilità (Raji) o ancora da modifiche post-trascrizionali<sup>99</sup> (SU-DHL-4). L'overpressione di c-Myc è stata confermata dalla valutazione citofluorimetrica dei livelli basali di proteina. Infatti, come mostrato in figura 4.1, le linee cellulari analizzate mostrano un'intensità di fluorescenza fino a 9 volte maggiore rispetto ai linfociti B CD19+ sani isolati da sangue periferico.

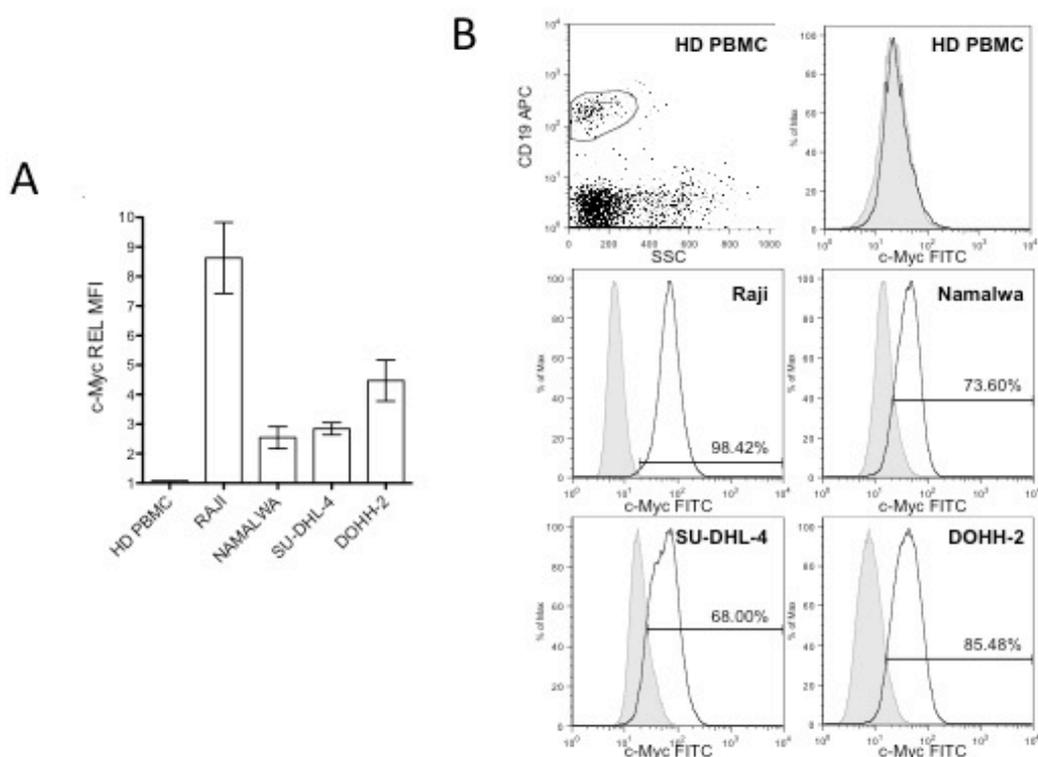


Fig.4.1: *Caratterizzazione del livello di espressione basale di c-Myc in linee di B-NHL*

(A) Livelli proteici di c-Myc misurati mediante citometria a flusso. I valori di intensità di fluorescenza media relativa (REL MFI) rappresentati dagli istogrammi sono stati calcolati come rapporto tra intensità di fluorescenza media (MFI) di ciascun campione rispetto al controllo isotipico. I dati riportati in figura rappresentano la media ( $\pm$ ES) di tre esperimenti. (B) Istogrammi rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica (istogramma grigio, controllo isotipico; istogramma nero, campione marcato).

La dose ottimale di farmaco da utilizzare per i trattamenti *in vitro* è stata calcolata mediante saggi di citotossicità basati sull'utilizzo del colorante vitale MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Le linee cellulari sono state trattate con una scala di dosi da 0  $\mu\text{M}$  a 0,8  $\mu\text{M}$  di ITF2357 e dopo un tempo di incubazione pari a 48 ore è stata calcolata la media dei valori di  $\text{Ic}_{50}$  (concentrazione di farmaco che inibisce il 50% delle cellule target) che era approssimativamente di 0,2  $\mu\text{M}$  (dati non mostrati). Una volta determinata la concentrazione ottimale da utilizzare, sono stati allestiti gli esperimenti *in vitro* per caratterizzare l'attività di ITF2357.

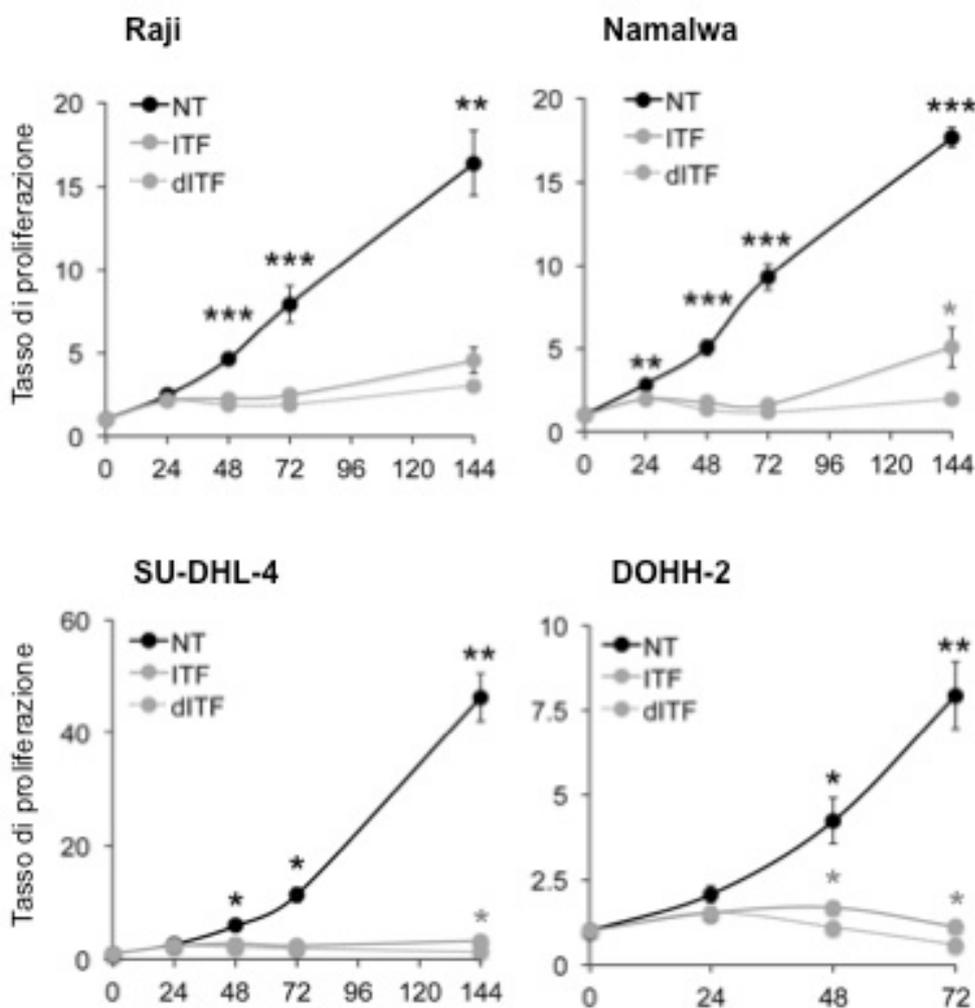


Fig. 4.2 ITF2357 riduce la proliferazione cellulare in linee di B-NHL *c-Myc*<sup>+</sup>

Inibizione della proliferazione cellulare in seguito a trattamento con ITF2357. Le cellule Raji, Namalwa, DOHH-2 e SU-DHL-4 sono state trattate con ITF2357 0,2  $\mu\text{M}$  una sola volta (linea grigia) o quotidianamente (linea grigia tratteggiata). La proliferazione è stata monitorata fino a 72 o 144 ore ad intervalli di 24 ore. Nei grafici mostrati in figura, la proliferazione cellulare è rappresentata come aumento del numero di cellule rispetto al numero di cellule seminate. I valori riportati rappresentano la media ( $\pm\text{ES}$ ) di quattro esperimenti indipendenti. Le differenze statisticamente significative tra le cellule trattate e non trattate (\* nero) oppure tra il trattamento singolo e quello ripetuto (\* grigio) all'interno dello stesso tempo sono state calcolate mediante il test *t* di Student (\* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ).

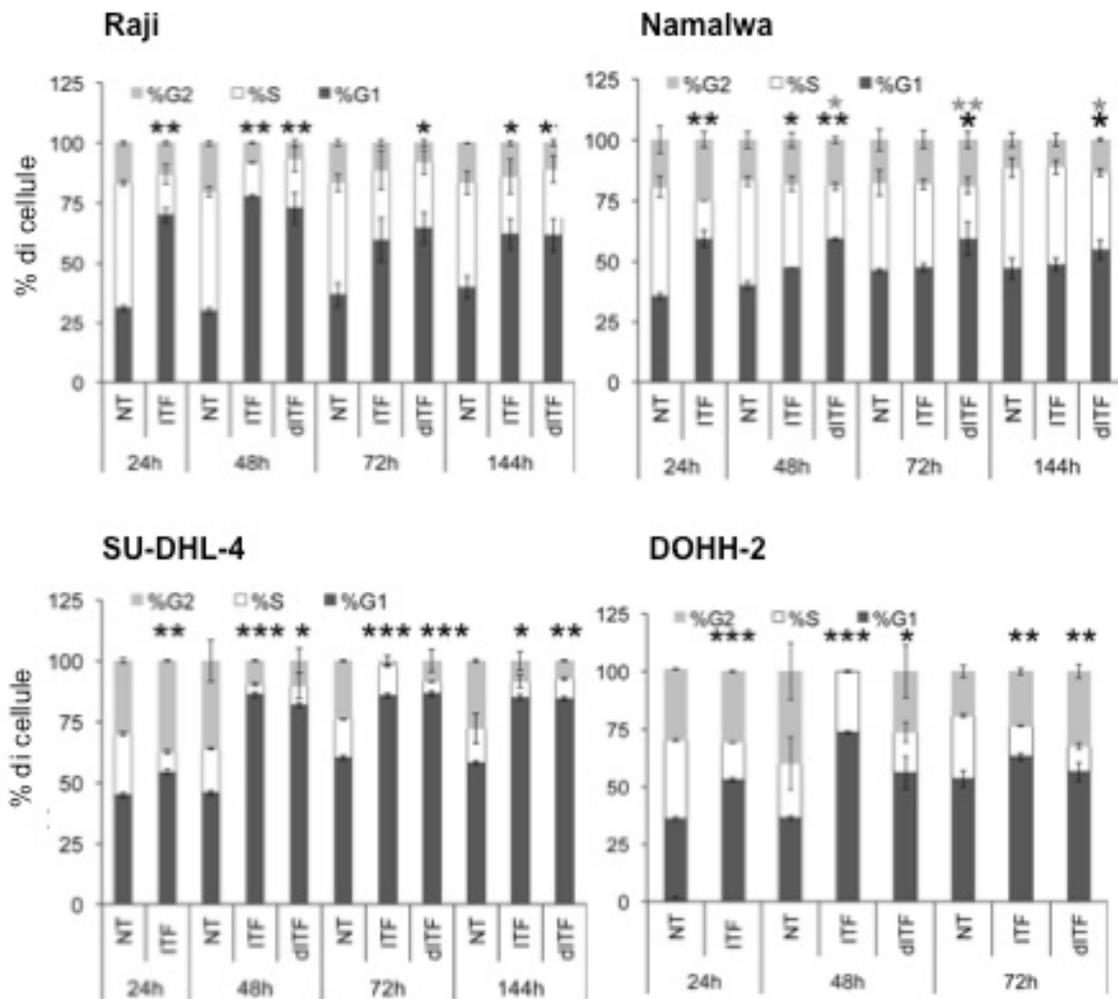
Le cellule Namalwa, Raji, DOHH-2 e SU-DHL-4 sono state trattate con una concentrazione di ITF2357 pari a  $0,2\mu\text{M}$  una sola volta o ad intervalli ripetuti di 24 ore, in considerazione della breve emivita del farmaco. I risultati ottenuti dai conteggi cellulari effettuati ogni 24 ore dimostrano che una singola somministrazione di farmaco è in grado di bloccare la proliferazione cellulare fino a 72 ore dal trattamento in maniera simile in tutte le linee cellulari testate (Raji e Namalwa  $***P<.001$ , DOHH-2 e SU-DHL-4  $**P<.01$ ). Come mostrato dai grafici relativi alle curve di crescita in figura 4.2, le cellule DOHH-2, Namalwa, SU-DHL-4 e Raji mostrano una percentuale d'inibizione della crescita a 72 ore dal trattamento pari a  $86\pm 2\%$ ,  $83\pm 2\%$ ,  $79\pm 1\%$ ,  $69\pm 3\%$  rispettivamente. Inoltre, il trattamento giornaliero con ITF2357 potenzia ulteriormente questo effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare in particolar modo nelle cellule Namalwa.

#### 4.1.2 EFFETTI CITOSTATICI E/CITOTOSSICI ASSOCIATI ALL'ATTIVITÀ DI ITF2357

Per caratterizzare se l'attività antiproliferativa di ITF2357 è associata ad effetti citotossici e/o citostatici è stato misurato il livello di apoptosi e analizzata la distribuzione delle fasi del ciclo cellulare prima e dopo il trattamento con ITF2357 ad intervalli di 24 ore. Dai risultati ottenuti si evince che le diverse linee cellulari mostrano una differente sensibilità ai trattamenti farmacologici con l'HDAC inibitore.

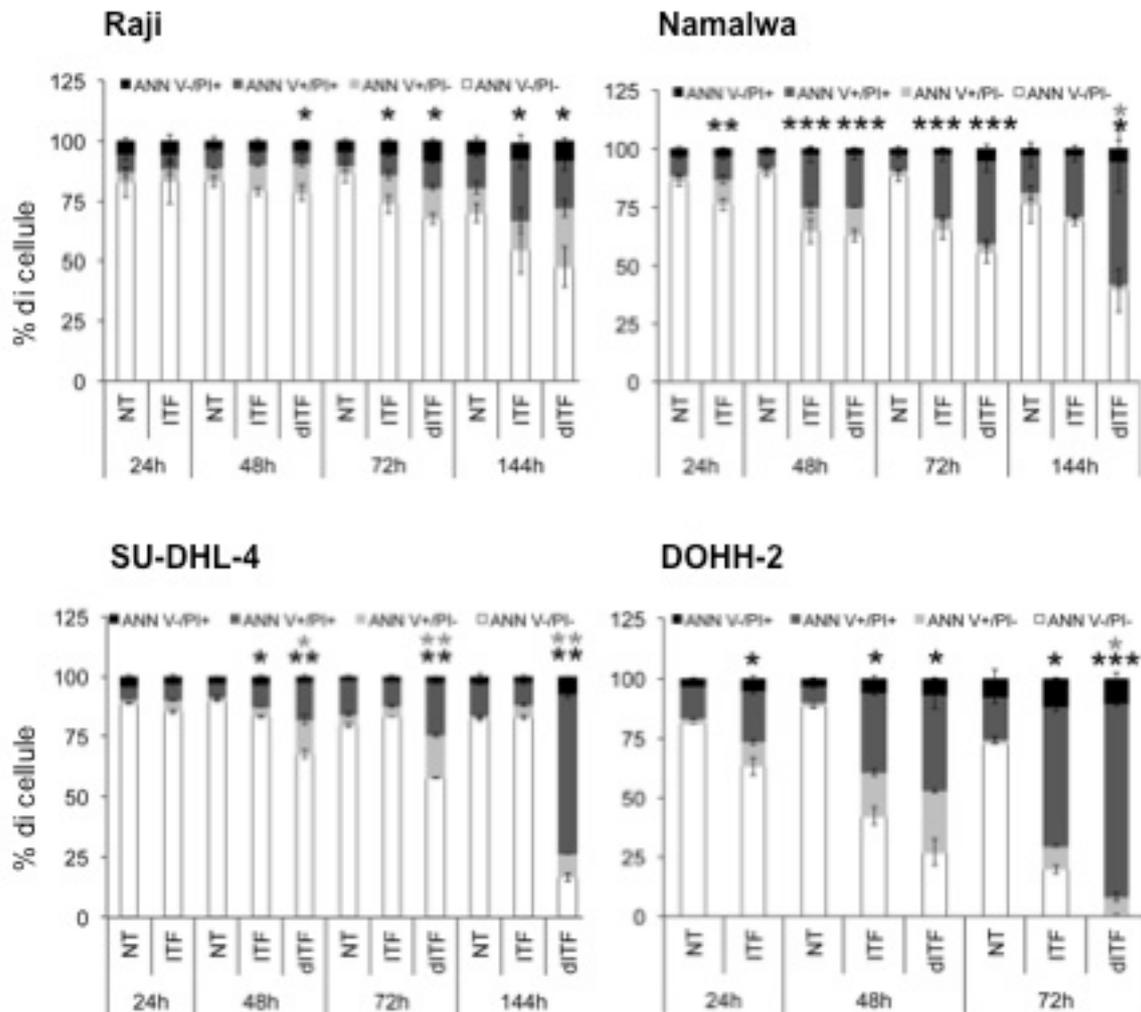
L'inibizione della proliferazione osservata nelle linee Raji e SU-DHL-4 è prevalentemente associata ad un blocco del ciclo cellulare in fase G1 piuttosto che ad un aumento di apoptosi. In queste linee cellulari il trattamento con ITF2357 induce un blocco del ciclo in fase G1 che raggiunge i massimi livelli a 48 ore e si protrae fino a 144 ore anche in assenza di trattamento ripetuto. Infatti, è stata registrata una percentuale di cellule in fase G1 del 60% nel caso delle cellule Raji e dell'80% nel caso della linea SUDHL4 che rimane costante fino al termine dei trattamenti farmacologici (fig. 4.3). L'induzione di apoptosi, invece, risulta significativa solamente a 48 ore ed in presenza di quotidiano. Solo nel caso della linea cellulare SU-DHL-4 la somministrazione ripetuta di ITF2357 è in grado di provocare un consistente aumento delle cellule apoptotiche a 144 ore (fig. 4.4).

Diversamente, le cellule DOHH-2 e Namalwa mostrano una maggiore sensibilità all'attività citotossica di ITF2357. Infatti, ad un iniziale blocco del ciclo osservato a 24 ore in cui si registra un accumulo di cellule in fase G1, segue un progressivo aumento della mortalità in maniera dose e tempo dipendente (fig. 4.3-4.4). L'induzione di apoptosi raggiunge livelli significativi già dopo 24 ore di incubazione con il farmaco ed aumenta progressivamente fino a 72 ore, come dimostrato dal consistente aumento della percentuale di cellule ANN V+/PI+.



**Fig. 4.3** *Perturbazione del ciclo cellulare in seguito al trattamento con ITF2357 in linee cellulari di B-NHL c-Myc+*

Valutazione della distribuzione del ciclo cellulare nelle cellule Raji, Namalwa, DOHH-2 e SU-DHL-4 in seguito a trattamento con ITF2357 (0,2  $\mu$ M) singolo (ITF) o ripetuto (dITF). La distribuzione nelle varie fasi del ciclo è stata valutata ad intervalli di 24 ore al citofluorimetro mediante colorazione con PI come riportato nel capitolo Materiali e Metodi. Gli istogrammi rappresentano la frequenza delle cellule in G1 (colonna grigio scuro), in fase S (colonna bianca) e delle cellule in G2 (colonna grigio chiaro). I grafici rappresentano la media ( $\pm$  ES) di quattro esperimenti indipendenti. Le differenze statisticamente significative tra le cellule trattate e non trattate (\* nero) oppure tra il trattamento singolo e quello ripetuto (\* grigio) all'interno dello stesso tempo sono state calcolate mediante il test *t* di Student (\* $P$ <.05, \*\* $P$ <.01, \*\*\* $P$ <.001).



**Fig. 4.4 Effetti citotossici associati all'attività di ITF2357 in linee di B-NHL c-Myc+**

Valutazione della quota di apoptosi nelle cellule Raji, Namalwa, DOHH-2 e SU-DHL-4 in seguito a trattamento con ITF2357 ( $0,2 \mu\text{M}$ ) singolo (ITF) o ripetuto (dITF). I livelli di apoptosi sono stati valutati in citofluorimetria attraverso la doppia marcatura Annessina V/PI come riportato nel capitolo Materiali e Metodi. Gli istogrammi rappresentano le percentuali di cellule nelle varie fasi dell'apoptosi: colonna bianca, cellule vive ANNV-/PI-; colonna grigio chiaro, cellule in apoptosi precoce ANNV+/PI-; colonna grigia, cellule ANNV+/PI+ in apoptosi tardiva; colonna nera, cellule ANNV-/PI+ necrotiche. I valori riportati rappresentano la media ( $\pm$  ES) di quattro esperimenti indipendenti. Le differenze statisticamente significative tra le cellule trattate e non trattate (\* nero) oppure tra il trattamento singolo e quello ripetuto (\* grigio) all'interno dello stesso tempo sono state calcolate mediante il test *t* di Student (\* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ).

## 4.2 CARATTERIZZAZIONE DEL MECCANISMO D'AZIONE DI ITF2357 *IN VITRO*

### 4.2.1 MODULAZIONE DEI LIVELLI DI ACETILAZIONE DEI PRINCIPALI TARGET DEGLI HDAC

Per verificare che l'attività antitumorale del pan-inibitore degli HDAC ITF2357 osservata *in vitro* dipenda dall'effettiva inibizione degli enzimi HDAC, sono stati analizzati i livelli di acetilazione dell'istone H3 e della proteina tubulina come esempio di proteine istoniche e non-istoniche regolate a livello post-traduzionale da questi enzimi. L'analisi mediante saggio western blot conferma che ITF2357 induce, già dopo 24 ore di incubazione, un aumento dell'acetilazione dell'istone H3 e H4 che persiste nel tempo se il trattamento è quotidiano (fig. 4.5).

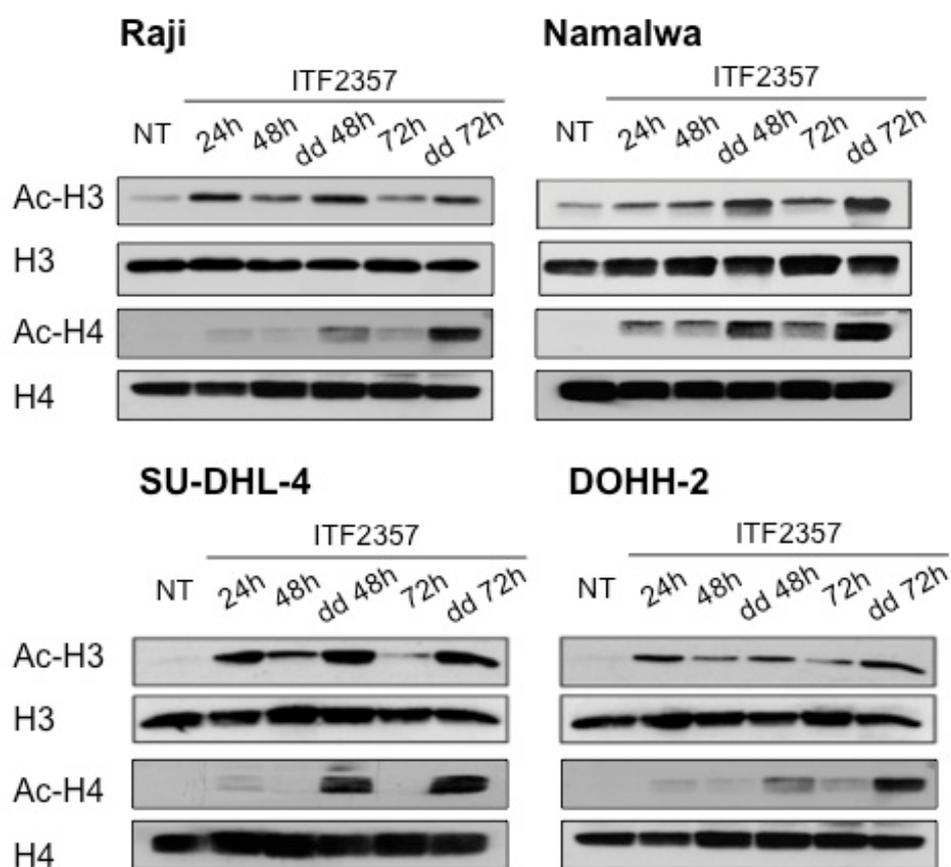
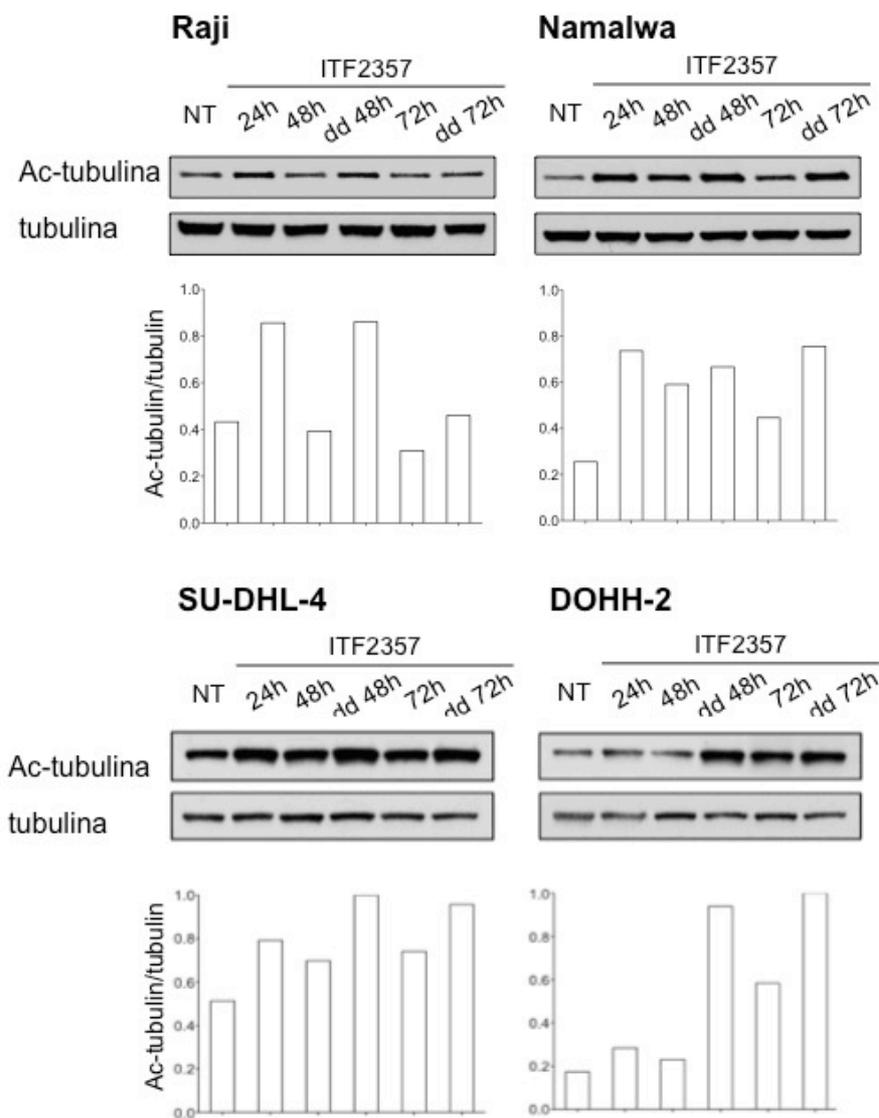


Fig.4.5 *Modulazione dei livelli di acetilazione delle proteine istoniche H3 ed H4*

Analisi mediante western blot della modulazione dei livelli di acetilazione degli istoni H3 ed H4. Le cellule Raji, Namalwa, DOHH-2 e SU-DHL-4 sono state coltivate in assenza o in presenza di ITF2357 (0,2 $\mu$ M) somministrato una sola volta o ad intervalli di 24 ore (dd). Le immagini sono state acquisite usando lo scanner Microtek ArtScan F1.

In maniera simile anche i livelli di acetilazione della tubulina, proteina citoplasmatica non-istonica e substrato specifico dell'enzima HDAC6, subiscono un rapido aumento nel tempo in tutte le linee cellulari testate ad eccezione per la linea Raji, dove il trattamento giornaliero non è in grado di preservare l'acetilazione fino a 72 ore (fig. 4.6).

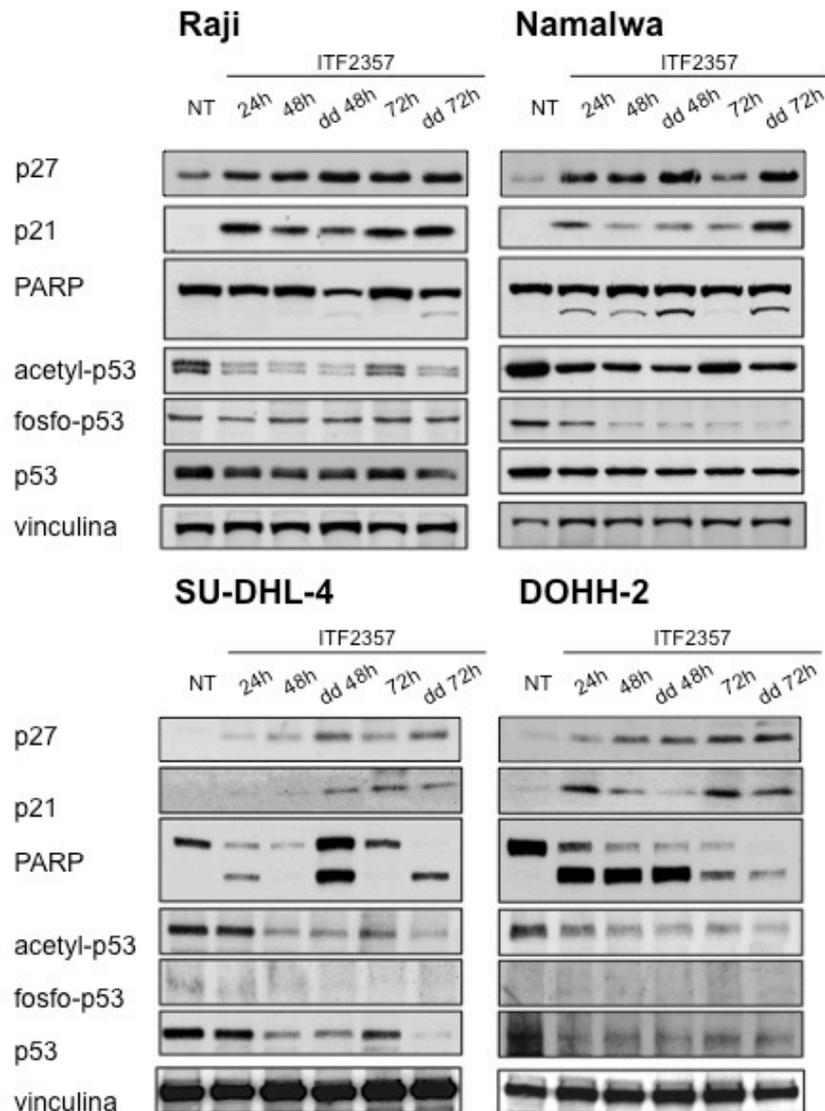


**Fig.4.6 Modulazione dei livelli di acetilazione della proteina tubulina, target dell'HDAC6**

Analisi mediante western blot della modulazione dei livelli di acetilazione della proteina tubulina. Le cellule Raji, Namalwa, DOHH-2 e SU-DHL-4 sono state coltivate in assenza o in presenza di ITF2357 (0,2 $\mu$ M) somministrato una sola volta o ad intervalli di 24 ore (dd). Il contenuto della proteina vinculina è mostrato come controllo interno di caricamento. Le immagini sono state acquisite usando lo scanner Microtek ArtScan F1. Gli istogrammi rappresentano i valori densitometrici ottenuti mediante l'analisi con il software ImageJ delle immagini riportate in figura.

#### 4.2.2 MODULAZIONE DELLE PRINCIPALI MOLECOLE CITOSTATICHE E PRO-APOPTOTICHE

Gli effetti citostatici e citotossici di ITF2357, osservati precedentemente nell'analisi del ciclo cellulare e della percentuale di apoptosi, sono stati confermati dall'aumento progressivo delle proteine p21 e p27, molecole che arrestano la progressione del ciclo cellulare a livello del checkpoint G1/S, e dall'aumento del clivaggio di PARP, substrato finale delle caspasi attivatrici nel processo di apoptosi (fig. 4.7).



**Fig. 4.7** *Analisi dei pathway molecolari associati all'attività anti-linfoma di ITF2357*

Analisi mediante western blot degli estratti proteici totali delle cellule Raji, Namalwa, DOHH-2 e SU-DHL-4 trattate con ITF2357 (0,2 μM) una sola volta o ad intervalli di 24 ore (dd). Il contenuto della proteina vinculina è mostrato come controllo interno di caricamento. Le immagini sono state acquisite usando lo scanner Microtek ArtScan F1.

In particolare, la diversa cinetica del clivaggio di PARP osservata nelle diverse linee cellulari riflette la differente sensibilità all'attività anti-tumorale di ITF2357 e conferma i dati dei test citofluorimetrici per la determinazione dell'apoptosi. Le cellule Namalwa e DOHH-2 mostrano un clivaggio persistente di PARP in seguito a singola somministrazione del farmaco, nelle cellule SU-DHL-4 è necessario il trattamento quotidiano, mentre le cellule Raji mostrano un clivaggio molto limitato con entrambe le condizioni di trattamento.

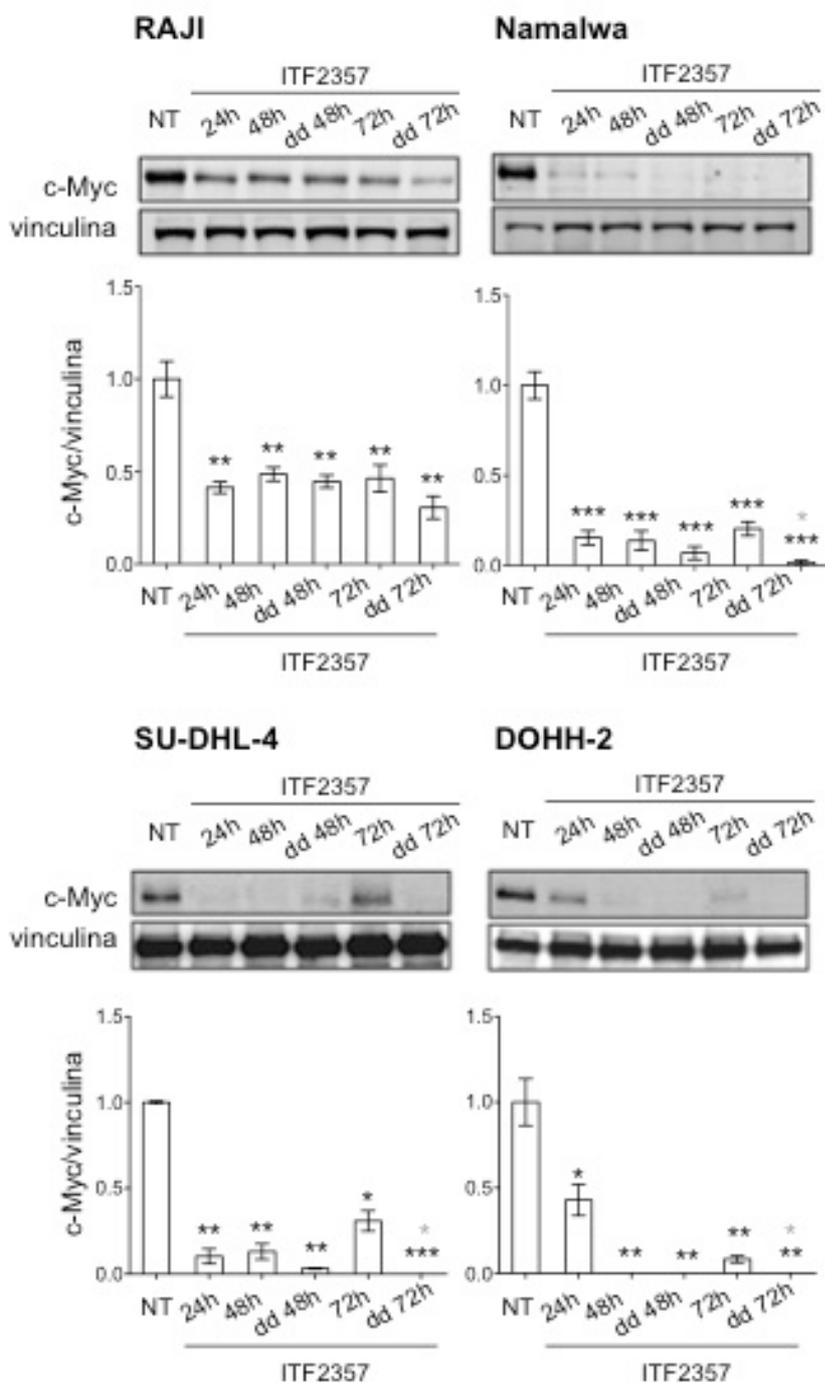
Nessuno dei due effetti indotti da ITF2357 sembra essere correlato all'attivazione di p53. Infatti, come mostrato in figura 4.7, il trattamento con ITF2357 non induce una stabilizzazione della proteina p53 in quanto non si verifica un aumento della sua fosforilazione a livello della Ser15. In accordo con questi dati, nonostante si registri un aumento dei livelli di acetilazione di proteine nucleari e citoplasmatiche (istone H3 e H4, tubulina)(fig. 4.5,4.6), la quota di p53 acetilata sembra diminuire anziché aumentare dopo il trattamento con ITF2357 (fig.4.7).

#### 4.2.3 MODULAZIONE DEI LIVELLI PROTEICI DI C-MYC

Alla luce del ruolo centrale della proteina c-Myc nel processo di linfomagenesi, sono stati analizzati i livelli di espressione della proteina a diversi tempi dal trattamento singolo o ripetuto per comprendere se l'attività anti-linfoma di ITF2357 è associata all'inibizione di c-Myc. Le analisi densitometriche dei risultati ottenuti mediante saggi in western blot (fig. 4.8) dimostrano che, dopo 24 ore di incubazione con il farmaco, nelle linee Namalwa, DOHH-2, SU-DHL-4 e Raji i livelli di proteina c-Myc subiscono un decremento rispettivamente del  $85\pm 4\%$ ,  $57\pm 13\%$ ,  $90\pm 4\%$ ,  $45\pm 12\%$  (Namalwa  $***P<.001$ ; DOHH-2  $*P<.05$ ; SU-DHL-4 e Raji  $**P<.01$ ) e che il trattamento ripetuto potenzia questo effetto. Infatti, in tutte le linee cellulari, l'inibizione di c-Myc raggiunge i massimi livelli a 72 ore se ITF2357 è somministrato quotidianamente (Namalwa, SU-DHL-4  $***P<.001$ ; Raji, DOHH-2  $**P<.01$ ). Gli effetti citostatici e citotossici indotti dal trattamento con ITF2357 sembrano quindi essere associati alla riduzione dei livelli proteici di c-Myc, piuttosto che ad una attivazione dell'oncosoppressore p53.

E' interessante osservare che il grado di down-regolazione della proteina c-Myc nelle diverse linee cellulari correla positivamente con il clivaggio di PARP a tutti i tempi analizzati (Pearson  $r=0,6449$ ,  $P=0,0021$ ) risultando quindi strettamente associato all'attività pro-apoptotica di ITF2357 (fig. 4.9). Inoltre, a 72 ore dal trattamento singolo con ITF2357 che approssimativamente rappresenta la fine dell'effetto antitumorale, il grado di down-modulazione di c-Myc (Raji:  $54\pm 7\%$ ; SU-DHL-4:  $69\pm 6\%$ ; Namalwa:  $79\pm 4\%$ ; DOHH-2:  $92\pm 8\%$ ) correla positivamente con la percentuale di inibizione della crescita nelle diverse linee cellulari (Pearson  $r=0,9807$ ,  $P=0,0193$ ) (fig. 4.9). Questi dati indicano che, nelle linee di linfoma non-Hodgkin a cellule B c-Myc positive, ITF2357 esercita la sua attività

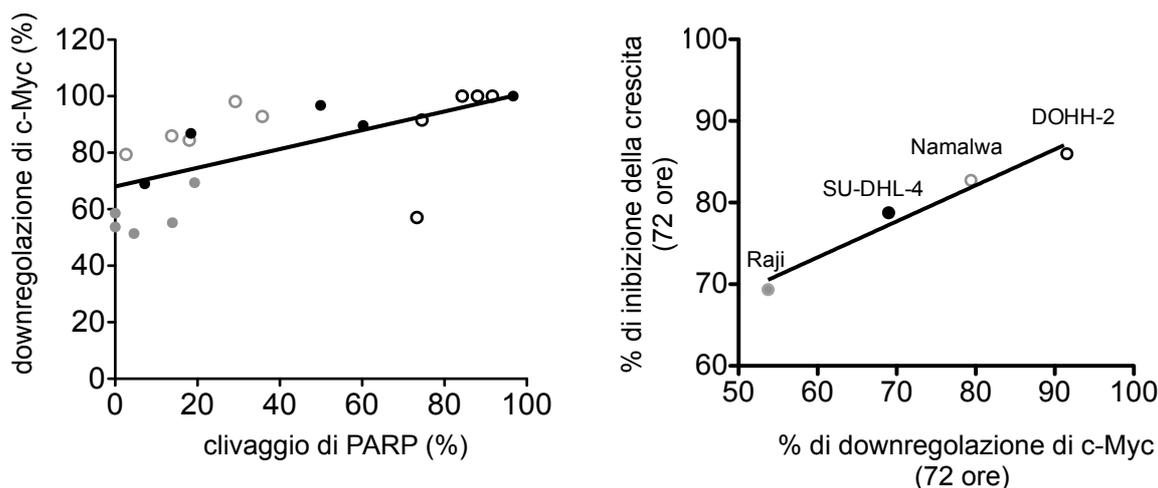
antitumorale in funzione della sua abilità di inibire la proteina c-Myc.



**Fig. 4.8** Modulazione dei livelli proteici di c-Myc in linee B-NHL c-Myc+ trattate con ITF2357.

I livelli della proteina c-Myc sono stati determinati rispettivamente dalla quantificazione densitometrica delle analisi in western blot nelle cellule Raji, Namalwa, SU-DHL-4 and DOHH-2 incubate ai tempi indicati in assenza (NT) o in presenza di ITF2357 0.2  $\mu$ M somministrato una sola volta o quotidianamente (dd). Per ciascuna condizione di trattamento, il livello di proteina c-Myc è stata normalizzata c-Myc sul rispettivo contenuto di vinculina. I dati riportati in figura rappresentano la media ( $\pm$  ES) di 5 esperimenti indipendenti. Gli asterischi indicano il livello di significatività statistica analizzata mediante il test *t* di Student (\* $P$  < .05, \*\* $P$  < .01, \*\*\*  $P$  < .001; asterisco nero, ciascun campione rispetto al non trattato; asterisco grigio, campioni trattati una sola volta rispetto a quelli trattati giornalmente).

Inoltre, l'inibizione di c-Myc più tardiva non sembra essere associata alla presenza della traslocazione del gene sotto il promotore delle Ig, ma sembra dipendere dalla presenza della mutazione puntiforme (T58A) che stabilizza la proteina preservandola maggiormente dalla degradazione, come nel caso delle cellule Raji<sup>26</sup>, la linea meno sensibile al trattamento con ITF2357.



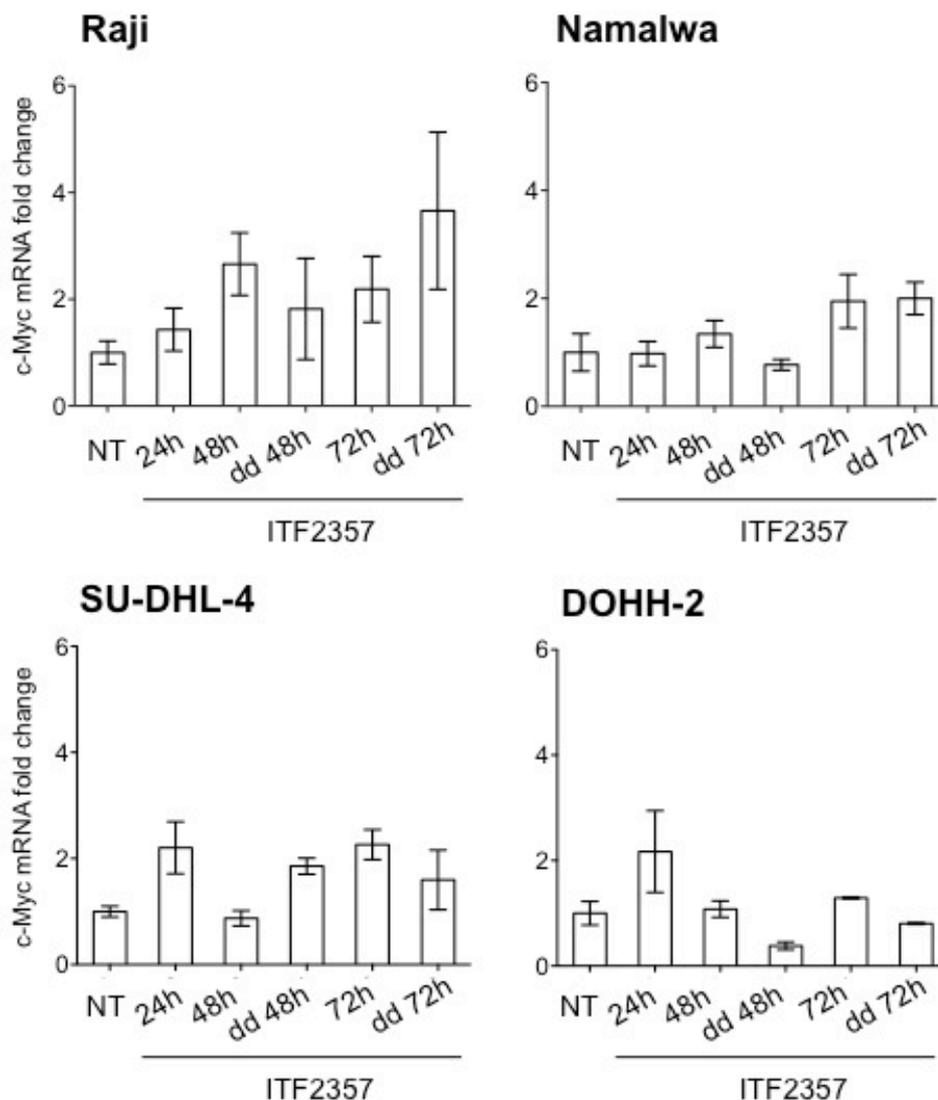
**Fig. 4.9** Analisi di correlazione tra l'attività anti-linfoma di ITF2357 e la down-regolazione di c-Myc

Analisi di correlazione tra il clivaggio di PARP e la down-regolazione di c-Myc analizzata in western blot (a sinistra) e tra la down-regolazione di c-Myc e l'inibizione della crescita cellulare a 72 ore dal trattamento singolo con ITF2357 (a destra). Tondo grigio, Raji; tondo nero, SU-DHL-4; cerchio grigio, Namalwa; cerchio nero, DOHH-2.

#### 4.2.4 ITF2357 INTERFERISCE A LIVELLO POST-TRASCRIZIONALE SULLA REGOLAZIONE DELLA PROTEINA C-MYC

Considerato il ruolo pro-oncogenico di c-Myc nella linfomagenesi, è stato ipotizzato che la down-modulazione di questa proteina rappresenti l'evento che contribuisce maggiormente all'attività anti-linfoma di ITF2357. Pertanto, è stato analizzato il meccanismo attraverso cui ITF2357 down-regola i livelli di proteina c-Myc.

Per capire se ITF2357 agisce a livello trascrizionale o post-trascrizionale, è stata misurata la quantità di trascritto relativo a c-Myc in tutte le colture cellulari, prima e dopo trattamento, mediante RT-PCR. Inaspettatamente, in tutte le linee cellulari esaminate, i livelli di mRNA non subiscono nel tempo lo stesso decremento dei livelli di proteina, suggerendo che, indipendentemente dall'istotipo o dalla presenza della traslocazione genica, il farmaco agisce a livello post-trascrizionale piuttosto che a livello trascrizionale (fig. 4.10).

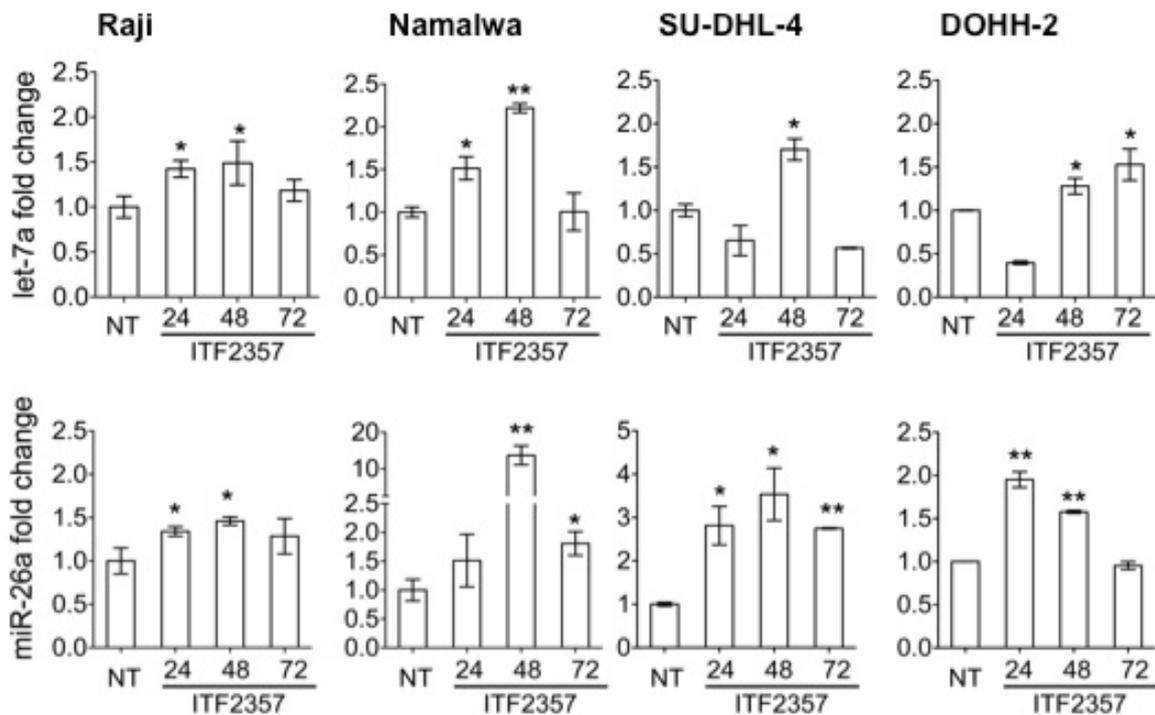


**Fig.4.10** Modulazione dei livelli di mRNA di *c-Myc* in linee B-NHL *c-Myc*<sup>+</sup> trattate con ITF2357.

I livelli di mRNA sono stati determinati mediante qPCR nelle cellule Raji, Namalwa, SU-DHL-4 and DOHH-2 incubate ai tempi indicati in assenza (NT) o in presenza di ITF2357 0.2  $\mu$ M somministrato una sola volta o quotidianamente (dd). Per ciascuna condizione di trattamento, i livelli di mRNA, una volta normalizzati rispetto al controllo GAPDH, sono espressi come *fold change* rispetto alle colture non trattate ad ogni tempo. I dati riportati in figura rappresentano la media ( $\pm$  ES) di 5 esperimenti indipendenti

Date le numerose evidenze in letteratura sull'importanza centrale dei microRNA nella regolazione post-trascrizionale di *c-Myc*, inizialmente è stata valutata la capacità di ITF2357 di indurre l'espressione di microRNA che regolano la traduzione dell'mRNA di *c-Myc* in proteina. Pertanto, sono stati analizzati mediante RT-PCR, i livelli intracellulari dei due principali microRNA che regolano la traduzione di *c-Myc*, Let-7a e miR-26a. In tutti i modelli cellulari analizzati, entrambi i micro RNA risultano significativamente indotti fino

a 48 ore dal trattamento singolo con ITF2357 (fig. 4.11) confermando quindi che l'up-regolazione di microRNA rappresenta un meccanismo importante attraverso cui ITF2357 riduce i livelli cellulari di proteina c-Myc.



**Fig. 4.11** Modulazione dell'espressione di microRNA in linee di B-NHL c-Myc+ trattate con ITF2357.

Espressione di Let-7a (in alto) and miR-26a (in basso) nelle linee cellulari Raji, Namalwa, SU-DHL-4 e DOHH-2 incubate con ITF2357 0.2  $\mu$ M ai tempi indicati. I dati riportati in figura rappresentano l'incremento dei livelli dei microRNA rispetto alle cellule non trattate a ciascun tempo. I risultati rappresentano la media ( $\pm$  ES) di tre esperimenti. Le differenze statisticamente significative tra i campioni trattati e quelli non trattati sono state calcolate con il test *t* di Student (\**P* < .05, \*\**P* < .01).

Tuttavia, l'induzione di let-7a e miR-26a non risulta persistente nel tempo e non giustifica l'inibizione dei livelli di proteina c-Myc fino a 72 ore dal trattamento osservata nelle analisi in western blot. Pertanto, è stato ipotizzato che ITF2357 potesse interagire con lo stato di attivazione del complesso di traduzione cap-dipendente, che controlla la traduzione di molte oncoproteine ed in modo specifico la traduzione di c-Myc. Questo processo è attivato attraverso il distacco di eIF4E, proteina in grado di legare il cap m<sup>7</sup>G a livello dell'mRNA, dal suo repressore 4EBP1. In seguito al distacco dall'inibitore, eIF4E lega eIF4G, determinando il corretto assemblaggio del complesso d'inizio eIF4F e quindi l'inizio della traduzione. La fosforilazione delle molecole che costituiscono il complesso d'inizio della traduzione determina la stabilizzazione dell'apparato, il corretto posizionamento delle

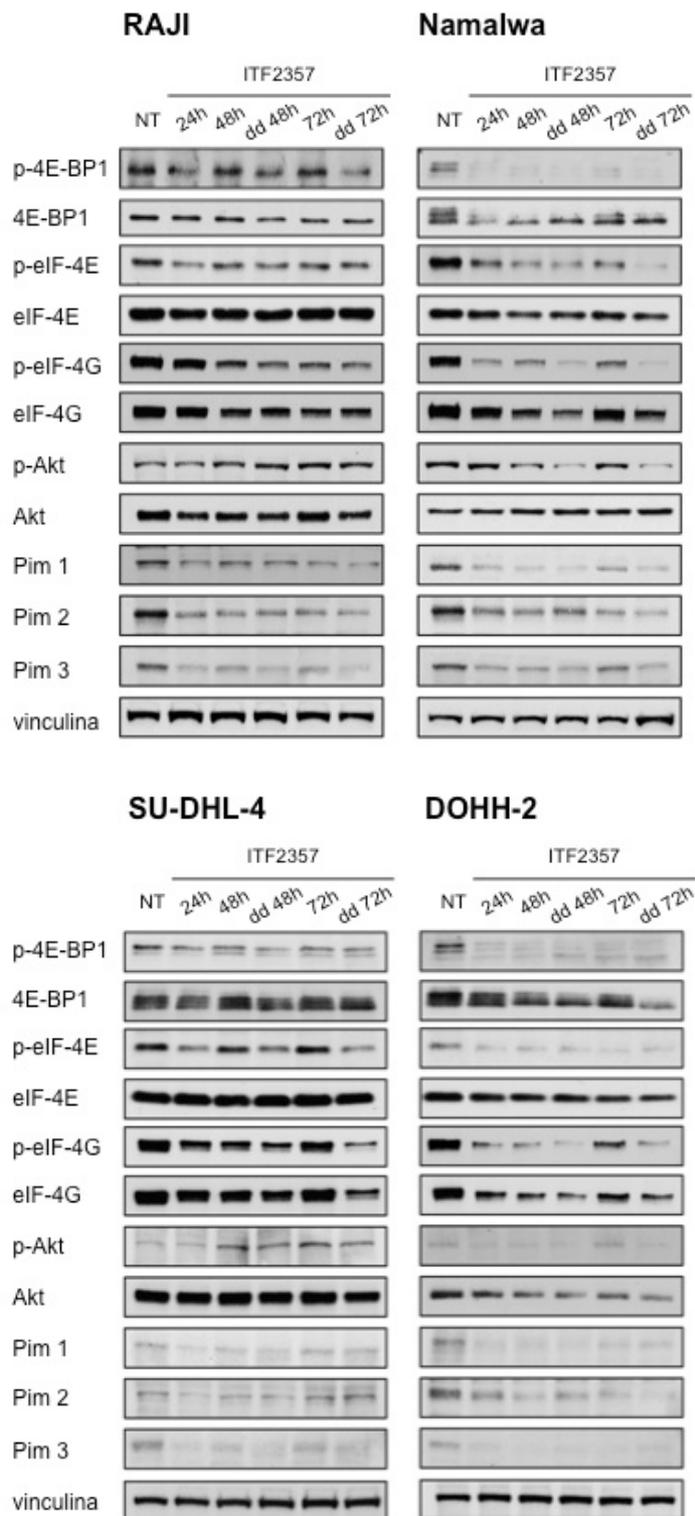
subunità ribosomiali a livello del cap  $m^7G$  e l'inizio della traduzione.

In tutte le linee cellulari, ITF2357 riduce la fosforilazione delle proteine 4EBP1, eIF4E ed eIF4G (fig. 4.12-4.13). Anche in questo caso, la quota di defosforilazione di queste molecole è associata all'inibizione di c-Myc ed al clivaggio di PARP. In particolare, le cellule Namalwa e DOHH-2 mostrano una persistente defosforilazione di queste proteine in seguito a trattamento singolo con ITF2357, mentre le linee cellulari Raji e SU-DHL-4 richiedono il trattamento quotidiano. Inoltre, è interessante notare che i livelli totali della proteina eIF4G diminuiscono in tutte le linee cellulari, mentre i livelli totali di 4EBP1 ed eIF4E si riducono solamente nelle cellule Namalwa e DOHH-2.

Per chiarire in che modo ITF2357 inibisce la traduzione cap-dipendente, sono stati analizzati i livelli di espressione e di attivazione delle proteine che regolano questo pathway. Le molecole chiave che regolano la traduzione cap-dipendente sono rappresentate dalle chinasi PIM e Akt. Una volta attivato il complesso mTOR, Akt fosforila e inattiva 4EBP1, le chinasi PIM1, PIM2 e PIM3, invece, aumentano l'espressione e la fosforilazione di eIF4E.

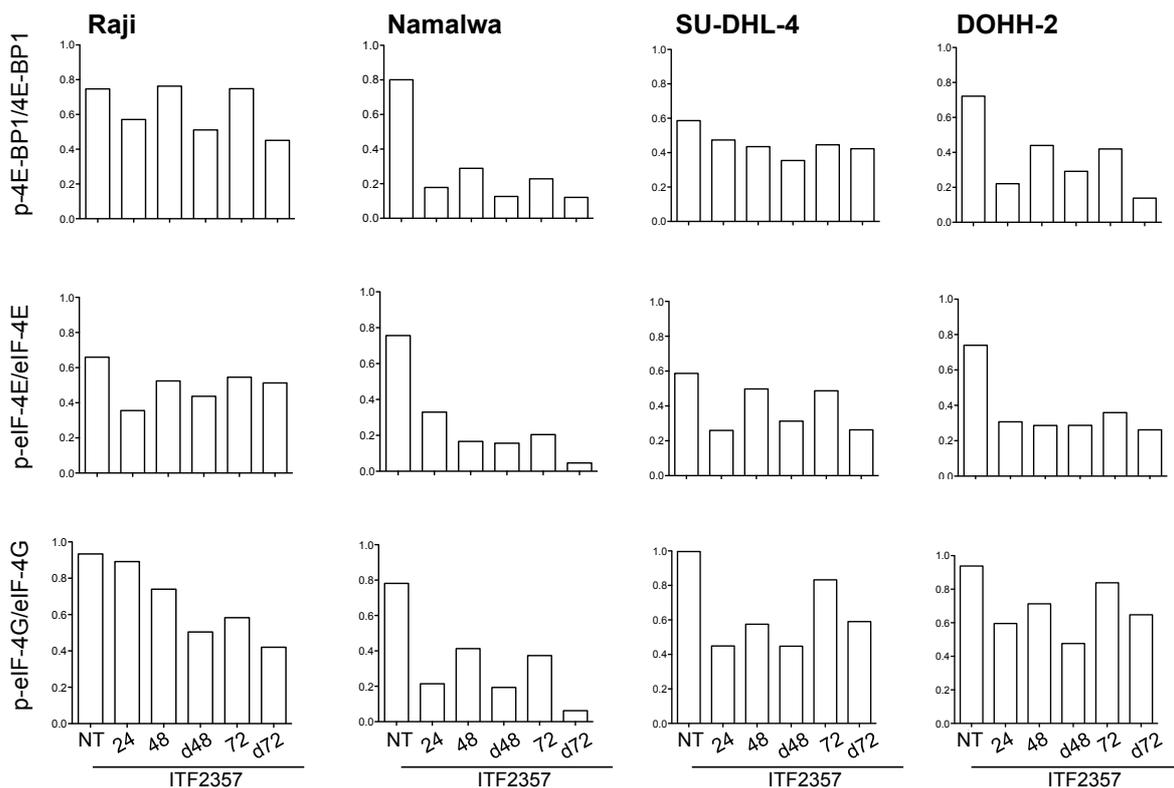
In tutti i modelli cellulari, una singola somministrazione di ITF2357 è in grado di ridurre i livelli proteici di tutte e tre le isoforme delle chinasi PIM, non sempre seguito dalla defosforilazione della chinasi Akt (fig. 4.12). Infatti, questi effetti risultano concomitanti solo nelle cellule Namalwa e DOHH-2. Nel caso della linea Raji, invece, il trattamento con ITF2357 provoca una riduzione dell'attivazione di eIF4E ed eIF4G nonostante non si osservi una riduzione della fosforilazione di Akt e non si registri una forte defosforilazione di 4EBP1. Questo risultato può essere giustificato dalla persistente inibizione da parte delle chinasi PIM che controllano la traduzione cap-dipendente a livello più basso rispetto alla via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR.

I risultati ottenuti dimostrano, quindi, che ITF2357 è in grado di interferire in isotipi diversi di linfomi c-Myc positivi attraverso i due più importanti meccanismi che controllano la traduzione dell'mRNA in proteina, i microRNA e la traduzione cap-dipendente, due meccanismi chiave che controllano l'espressione di c-Myc.



**Fig. 4.12** *Modulazione del complesso di traduzione cap-dipendente in linee di B-NHL c-Myc+ trattate con ITF2357.*

Analisi mediante western blot del complesso d'inizio della traduzione cap-dipendente e dei suoi maggiori regolatori molecolari nelle cellule Raji, Namalwa, SU-DHL-4 e DOHH-2 coltivate in assenza (NT) o in presenza di 0.2  $\mu$ M ITF2357 somministrato una sola volta o ad intervalli di 24 ore (dd). Il contenuto di vinculina è mostrato come controllo interno di corretto caricamento. Le immagini sono state acquisite con lo scanner Microtek ArtixScan F1, e ritagliate per le bande d'interesse con il programma Adobe Photoshop CS version 4 per Mac



**Fig. 4.13** Quantificazione della quota di fosforilazione delle molecole coinvolte nella traduzione cap-dipendente in linee di B-NHL c-Myc+ trattate con ITF2357.

Analisi densitometrica dei livelli di fosforilazione delle proteine 4E-BP-1, eIF4E, eIF4G relativi alle immagini riportate in figura 4.12. Gli istogrammi rappresentano il rapporto tra la quota fosforilata ed il totale dopo la normalizzazione di ciascuna banda sulla corrispettivo contenuto di vinculina. La quantificazione densitometrica è stata ottenuta attraverso l'analisi con il software ImageJ.

## 4.3 ATTIVITA' ANTI-LINFOMA DI ITF2357 *IN VIVO*

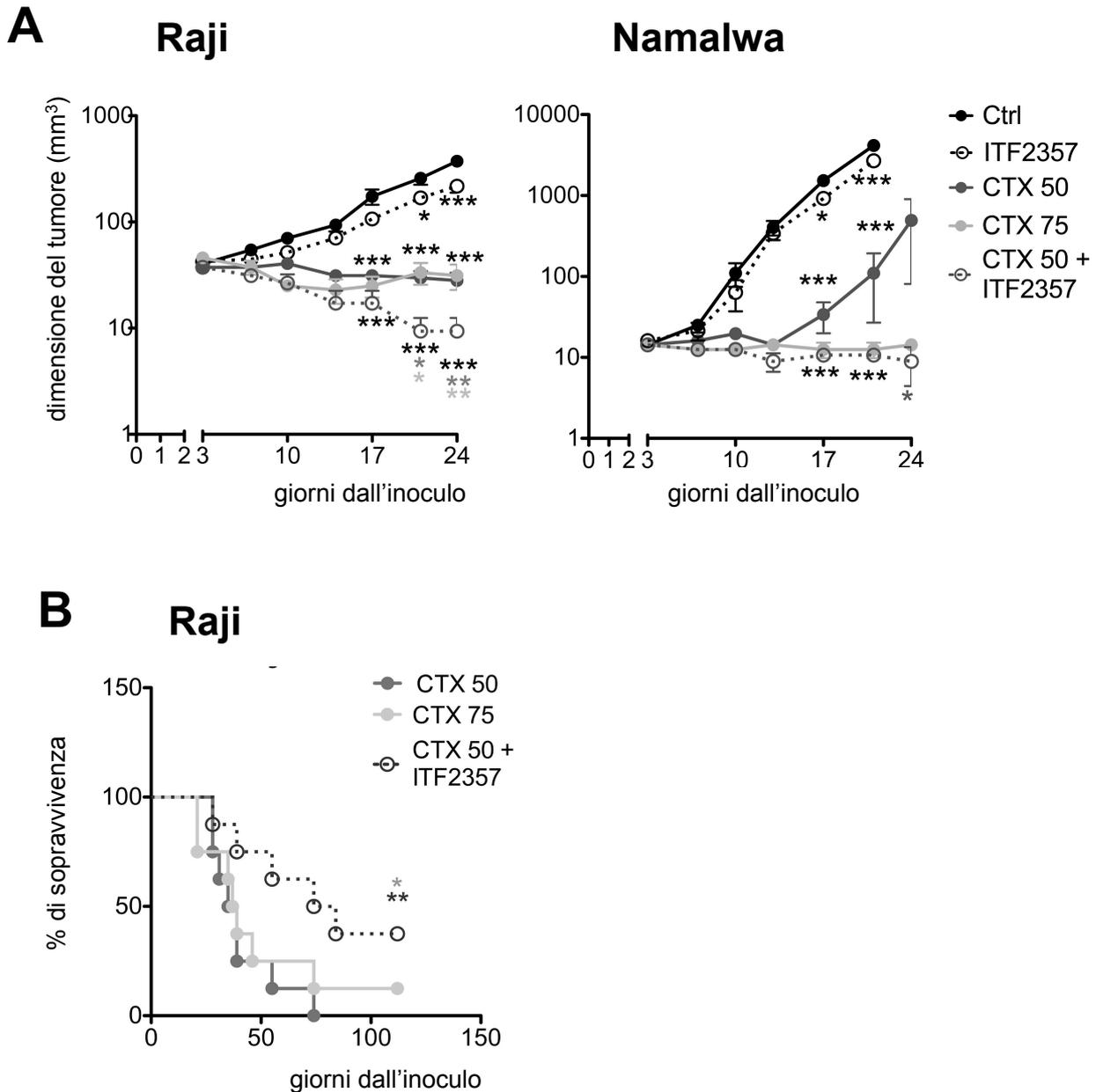
### 4.3.1 ATTIVITÀ TERAPEUTICA

Dopo aver caratterizzato l'attività antitumorale di ITF2357 *in vitro*, è stata valutata l'attività *in vivo* come singolo agente ed in combinazione con la chemioterapia per verificare se l'aggiunta di ITF2357 al trattamento convenzionale si traduce in un vantaggio terapeutico. A tale scopo, topi SCID sono stati xenotrapiantati sottocute con  $10^7$  cellule Raji e Namalwa e quando i noduli tumorali sono diventati misurabili (volume medio = 120 mm<sup>3</sup>) sono stati trattati per tre settimane con ITF2357 come singolo trattamento o in combinazione con ciclofosfamide (CTX) ad una dose subottimale (50 mg/kg). Inoltre, come controllo, tre gruppi di animali sono stati trattati con soluzione salina o CTX ad una dose ottimale (75 mg/kg) o subottimale (50 mg/kg). Le dosi di ITF2357 e CTX utilizzati per gli esperimenti *in vivo* sono state scelte in base a esperimenti preliminari in cui gli animali sono stati trattati con un *range* di dosi per identificare le concentrazioni di farmaco ottimali e non tossiche per gli animali. In accordo con questi dati, non sono state registrate perdite di peso significative o morti negli animali trattati con ITF2357 o CTX alla dose scelta prima che nei topi del gruppo di controllo (Tabella 1).

Dai dati ottenuti si osserva che, rispetto al gruppo di controllo, ITF2357 è in grado di rallentare significativamente la crescita *in vivo* di entrambe le linee cellulari (fig 4.14A) determinando un'inibizione della crescita dei noduli tumorali pari al 50.6% per le cellule Raji e al 42.7% per le cellule Namalwa dopo tre settimane di trattamento (Tabella 1). La somministrazione della dose ottimale di CTX blocca completamente la crescita della massa tumorale in entrambe le linee cellulari, ma con questo trattamento si ottiene solamente una risposta completa nei topi xenotrapiantati con le cellule Namalwa (fig 4.14; Tabella 1). Il trattamento con la dose subottimale di CTX, invece, è in grado di controllare la crescita delle cellule Raji ma non delle cellule Namalwa. Infatti, dopo il secondo ciclo di trattamento, i noduli delle cellule Namalwa iniziano a crescere in modo esponenziale (fig 4.14A).

L'aggiunta di ITF2357 al trattamento con la chemioterapia convenzionale aumenta in modo significativo l'efficienza terapeutica della CTX. Infatti, la somministrazione di ITF2357 in associazione alla CTX 50mg/kg determina un arresto della crescita dei noduli tumorali al pari (nel caso della linea Namalwa) o addirittura maggiore (nel caso delle cellule Raji) rispetto al trattamento con CTX alla dose ottimale e genera circa il 60% di risposte complete in entrambi i modelli al termine del trattamento (Tabella 1).

E' interessante osservare che, a differenza della linea cellulare Namalwa, le cellule Raji hanno mostrato una maggiore sensibilità al trattamento combinato piuttosto che al trattamento con CTX alla dose ottimale probabilmente perchè questa linea cellulare presenta una crescita *in vivo* più lenta rispetto alle cellule Namalwa (fig. 14A).



**Figura 4.14. Attività anti-linfoma in vivo di ITF2357 in combinazione con CTX**

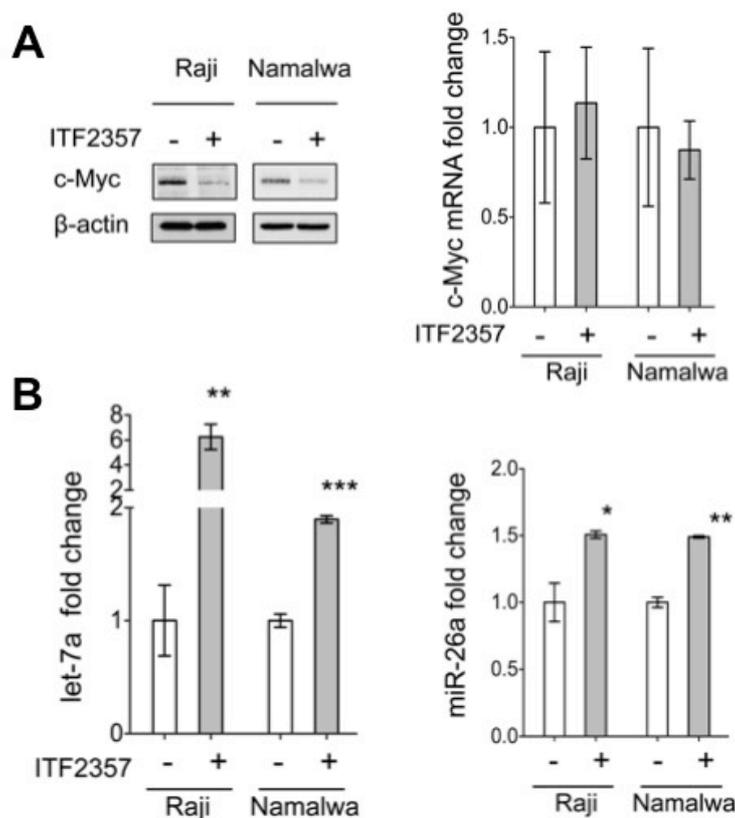
(A) Rappresentazione della crescita dei tumori sottocutanei delle cellule Raji (sinistra) e Namalwa (destra) cresciuti nei topi SCID trattati per 3 settimane (wks) con CTX ad una dose ottimale (75 mg/kg/week, linea grigio chiaro) o subottimale (50 mg/kg/week, linea grigia scura), oppure con ITF2357 come singolo trattamento (50 mg/kg/day, linea nera tratteggiata) o in combinazione con CTX ad una dose sub-ottimale (CTX 50 + ITF2357, linea grigia tratteggiata), oppure con soluzione salina come controllo (linea nera). (B) Rappresentazione della sopravvivenza dei topi xenotrapiantati con le cellule Raji trattati per 3 settimane con una dose ottimale (CTX 75, linea grigio chiaro), o subottimale (CTX 50, linea grigio scuro) di ciclofosfamida, oppure con la combinazione CTX 50 + ITF2357 (linea grigia tratteggiata). Gli animali sono stati monitorati fino a 112 giorni per verificare le ricadute. I risultati rappresentati in figura mostrano la media ( $\pm$  ES) del volume dei tumori di 8 (Raji) o 7 (Namalwa) animali per ciascun gruppo di due esperimenti indipendenti. Le differenze statisticamente significative negli animali trattati rispetto agli animali non trattati (asterisco nero) e tra i gruppi trattati con CTX 50- o CTX 75- e CTX 50 + ITF2357 (asterischi grigio chiaro e grigio scuro rispettivamente) sono state calcolate con il test ANOVA (\*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*\*\*  $P < .001$ ).

Per la valutazione della sopravvivenza, i topi xenotrapiantati con le cellule Raji sono stati monitorati anche dopo la fine del trattamento di 3 settimane ed al gruppo di animali che

aveva ricevuto il trattamento combinato, è stato somministrato ITF2357 giornalmente per altre tre settimane, simulando la procedura utilizzata in clinica di eseguire un trattamento di mantenimento. In questo caso, il trattamento con ITF2357 ha indotto un'eradicazione completa della malattia nel 37.5% degli animali che sono rimasti privi di malattia fino a 112 giorni dall'inoculo delle cellule, a differenza del trattamento con CTX che solo alla dose più alta e in solo caso ha prodotto una stabilizzazione della malattia (fig. 4.14B).

#### 4.3.2 MECCANISMO D'AZIONE

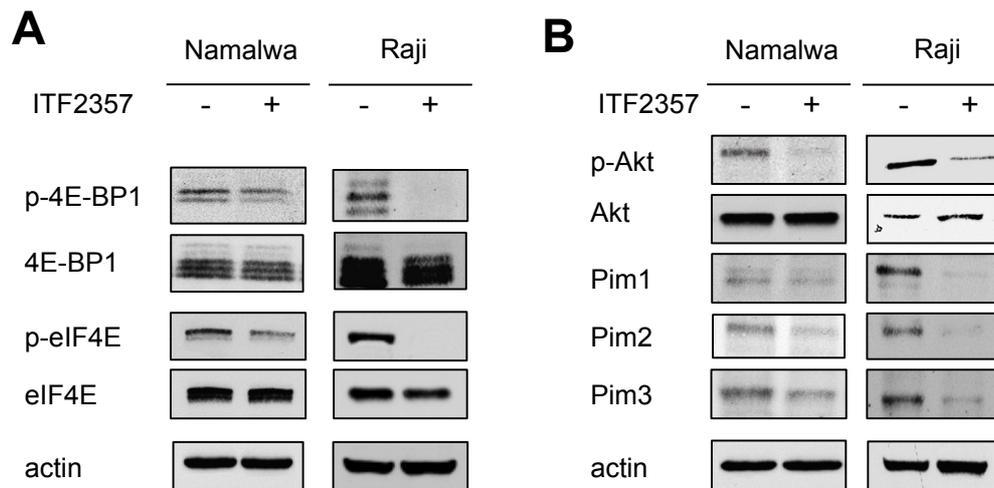
Al fine di confermare *in vivo* il meccanismo d'azione attraverso cui ITF2357 esercita la sua attività anti-linfoma, dopo tre settimane di trattamento i noduli tumorali sono stati escissi e processati per l'analisi biochimica e dell'mRNA.



**Fig. 4.15** *Analisi della modulazione della proteina c-Myc in seguito a trattamento con ITF2357 in vivo.*

Valutazione degli effetti mediati da ITF2357 *in vivo* in biopsie tumorali di topi xenotrapiantati con le cellule Raji e Namalwa trattate con ITF2357 (+) o soluzione salina (-) dopo 3 settimane di trattamento. (A) Valutazione dell'espressione dei livelli di proteina c-Myc e dell'mRNA. Nell'analisi in Western Blot il contenuto di actina è mostrato come controllo interno di corretto caricamento. Le immagini sono state acquisite con lo scanner Microtek ArtixScan F1 e ritagliate per le bande d'interesse con il programma Adobe Photoshop CS version 4 per Mac. Per ciascuna condizione di trattamento, i livelli di mRNA, una volta normalizzati rispetto al controllo GAPDH, sono espressi come *fold change* rispetto alle colture non trattate ad ogni tempo. (B) Analisi dei miRNA let-7a e mir-26a, I dati riportati in figura rappresentano l'incremento dei livelli dei microRNA rispetto al gruppo di controllo. Le differenze statisticamente significative tra i campioni trattati e non trattati sono state calcolate mediante il test *t* di Student (\* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ).

In linea con i dati ottenuti dagli esperimenti *in vitro*, i tumori trattati con ITF2357 *in vivo* hanno mostrato una riduzione dei livelli proteici di c-Myc ma non del rispettivo mRNA (fig. 15A) giustificata da una significativa induzione dei microRNA che bloccano la sintesi proteica di c-Myc, Let-7a (Namalwa \*\*\*P<.001; \*\*Raji P<.01) e miR-26a (Namalwa \*\*P<.01; Raji \*P<.05) (fig. 15B). Inoltre, l'analisi mediante saggio in western blot conferma che, anche *in vivo*, ITF2357 interferisce a livello della traduzione cap-dipendente riducendo la fosforilazione di tutte le molecole precedentemente analizzate *in vitro*. Infatti, in entrambe le linee cellulari, si osserva la defosforilazione delle molecole del complesso di traduzione, eIF4E e 4E-BP1 (fig. 4.16A), e la downmodulazione delle chinasi coinvolte nella regolazione della traduzione, PIM1, PIM2, PIM3 e Akt (fig. 4.16B). Pertanto, l'analisi del meccanismo d'azione di ITF2357 *in vivo* collima con i risultati ottenuti dalla caratterizzazione dell'effetto anti-tumorale *in vitro*: l'attività terapeutica di ITF2357 in modelli murini xenotrapiantati con linee cellulari di linfoma Burkitt dipende strettamente dall'inibizione dell'oncoproteina c-Myc attraverso l'induzione dei micro RNA e l'inibizione della traduzione cap-dipendente.



**Fig. 4.16** Analisi dello stato di attivazione della traduzione cap-dipendente in seguito a trattamento con ITF2357 *in vivo*.

Valutazione dello stato di attivazione del complesso di traduzione cap-dipendente (A) e dei suoi maggiori regolatori (B) in biopsie tumorali di topi xenotrapiantati con le cellule Raji e Namalwa trattate con ITF2357 (+) o soluzione salina (-) dopo 3 settimane di trattamento. Il contenuto di actina è mostrato come controllo interno di corretto caricamento. Le immagini sono state acquisite con lo scanner Microtek ArtixScan F1, e ritagliate per le bande d'interesse con il programma Adobe Photoshop CS version 4 per Mac. Le differenze statisticamente significative tra i campioni trattati e non trattati sono state calcolate mediante il test *t* di Student (\**P* < .05, \*\* *P* < .01, \*\*\* *P* < .001).

# DISCUSSIONE

I risultati presentati in questo progetto dimostrano che l'inibitore degli enzimi iston-deacetilasi ITF2357 è in grado di down-modulare l'espressione dell'oncoproteina c-Myc in linee di NHL a cellule B c-Myc positive, indipendentemente dalla presenza della traslocazione di c-Myc sotto le regioni promotrici dei geni codificanti per le Ig. Questa inibizione porta inevitabilmente ad un arresto del ciclo cellulare in fase G1, ad un induzione di apoptosi e ad un blocco della proliferazione in tutti i modelli cellulari utilizzati. La somministrazione di ITF2357 *in vivo* riduce significativamente la crescita delle masse tumorali in topi xenotrapiantati con linee cellulari di linfoma di Burkitt mentre il trattamento combinato con ciclofosfamide ad una dose sub-ottimale aumenta l'attività anti-linfoma di entrambi gli agenti farmacologici somministrati singolarmente generando anche delle remissioni complete che persistono nel tempo. E' stato anche dimostrato che la concomitante induzione dei micro RNA let-7a e miR-26a e l'inibizione della traduzione cap-dipendente rappresentano i due principali meccanismi che giustificano la persistente down-regolazione di c-Myc.

Il fattore trascrizionale c-Myc gioca un ruolo fondamentale nella proliferazione, nell'apoptosi e nel metabolismo cellulare attraverso la regolazione dei suoi geni target<sup>28</sup>. La sua trascrizione è rapidamente up-regolata in presenza di stimoli mitogeni e down-regolata durante il differenziamento terminale. L'importanza di c-Myc nella linfomagenesi è stata identificata per la prima volta nel linfoma di Burkitt<sup>4</sup>, in cui la proteina è traslocata sotto il promotore del gene delle catene pesanti o, meno frequentemente, delle catene leggere delle Ig, ed è stata poi confermata da studi in modelli murini transgenici E $\mu$ -Myc in cui 90% degli animali sviluppavano linfomi a cellule B durante i primi mesi di vita<sup>50</sup>. Per questi motivi, c-Myc rappresenta un bersaglio terapeutico per bloccare un meccanismo centrale per la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule linfomatose<sup>100-103,123</sup>. Purtroppo, la presenza di più domini funzionali rende difficilmente perseguibile con un singolo farmaco il blocco selettivo delle funzioni oncogeniche di c-Myc.

Recenti evidenze dimostrano che c-Myc è in grado di promuovere il suo programma trascrizionale interagendo con regolatori epigenetici, come gli HDAC<sup>10-12</sup>. Inoltre, l'attività degli HDAC contribuisce alla regolazione della proteina c-Myc. Infatti, è stato dimostrato che il legame dell'HDAC7 sulle regioni promotrici di c-Myc risulta indispensabile per una trascrizione efficiente del messaggero regolando direttamente l'architettura della cromatina del gene di c-Myc<sup>104</sup>. Pertanto, si è ipotizzato di ricorrere a sostanze in grado di agire a livello epigenetico, come gli inibitori degli HDAC, che in linea teorica dovrebbero revertire il fenotipo neoplastico indotto dall'overespressione di c-Myc. Questa ipotesi di lavoro è corroborata da recenti lavori in cui HDAC inibitori, come il vorinostat, il sodio butirato e il dispeptide, sono in grado non solo di bloccare l'attività trascrizionale di c-Myc, ma anche

di regolare la sua espressione sia in tumori ematologici sia in diversi modelli di tumori solidi<sup>89,105,106</sup>.

In tutte le linee cellulari di linfoma testate in questo progetto, è stato dimostrato che ITF2357 riduce l'espressione della proteina c-Myc esclusivamente attraverso due meccanismi: l'induzione dei principali microRNA che bloccano l'mRNA di c-Myc (Let-7a e miR-26a) e l'inibizione delle molecole indispensabili per la sua sintesi proteica.

Il trattamento farmacologico con ITF2357 induce un aumento della trascrizione dei microRNA Let-7a e miR-26a che determina una diminuzione dei livelli proteici di c-Myc ma non del relativo mRNA. In linea con i risultati ottenuti, precedenti studi hanno confermato che il meccanismo attraverso cui agiscono i microRNA è legato ad un blocco della traduzione piuttosto che ad una degradazione del trascritto c-Myc come dimostrato da: 1) la perdita di una complementarità perfetta tra l'mRNA di c-Myc e il suo maggior regolatore, let-7a, una condizione che solitamente favorisce la degradazione dell'mRNA target<sup>22</sup>; 2) la presenza di complessi c-Myc mRNA/microRNA quasi esclusivamente all'interno di polisomi funzionali e non in particelle subpolisomiali inattive traduzionalmente, dove solitamente avviene il clivaggio dell'mRNA<sup>107,108</sup>; 3) l'inibizione della traduzione di c-Myc mediata dai microRNA avviene nella fase più tardiva d'inizio della traduzione<sup>109</sup>. In accordo con i dati presentati, è stato dimostrato che i micro RNA let-7a e miR-26a sono fortemente repressi nei tumori che esprimono alti livelli di c-Myc<sup>22,110</sup>, e che la loro up-regolazione nei modelli di linfoma di Burkitt utilizzati in questa tesi è associata ad una repressione di c-Myc e all'inibizione della crescita cellulare<sup>21,22</sup>. Rimane ancora da chiarire se la loro induzione dopo trattamento con ITF2357 è una conseguenza di un diretto aumento dell'acetilazione degli istoni a livelli dei loro loci genici o il risultato di altri eventi molecolari anche se è noto che le modifiche epigenetiche indotte dall'utilizzo di farmaci inibitori delle HDAC possono anche controllare direttamente l'espressione di microRNA<sup>11,12,111</sup>.

Oltre all'induzione di micro RNA Let-7a e miR-26a, ITF2357 ha dimostrato di possedere la capacità di compromettere in modo significativo i processi che regolano la sintesi e la stabilizzazione della proteina c-Myc, rinforzando ulteriormente la sua attività anti-c-Myc. Nel cancro, l'attivazione della traduzione cap-dipendente determinata dal legame tra eIF4E ed eIF4G all'interno del complesso d'inizio della traduzione accoppiato alla concomitante fosforilazione di queste molecole, controlla la sintesi di diverse oncoproteine, tra cui anche c-Myc<sup>23</sup>. Il pathway PI3K/Akt/mTOR, e, più a valle, le chinasi PIM rappresentano invece le principali molecole chiave che regolano l'attivazione della traduzione cap-dipendente<sup>112</sup>. Oltre ad avere la capacità di attivare la traduzione dell'mRNA di c-Myc in proteina, queste

vie di segnalazione sono in grado di controllare la stabilità di c-Myc<sup>113,114</sup> e la sua transattivazione genica<sup>115</sup>, contribuendo a diversi livelli alla sua over-espressione. Numerosi studi evidenziano un ruolo fondamentale di questi pathway nella linfomagenesi guidata da c-Myc. Infatti, l'attivazione di PI3K<sup>116</sup>, delle chinasi PIM<sup>112,117</sup> o di eIF4E<sup>118</sup> accelera significativamente la formazione di masse tumorali in topi transgenici Eμ-Myc, indicando una stretta cooperazione tra questi *pathway* molecolari e c-Myc. E' interessante notare che le chinasi PIM sono espresse ad alti livelli in modo specifico nei linfomi follicolari<sup>112</sup>, nei linfomi diffusi a grandi cellule<sup>119</sup> e nel linfoma mantellare<sup>120</sup> e che l'espressione aberrante è associata ad una scarsa risposta ai trattamenti farmacologici convenzionali. Pertanto, questi enzimi sono stati recentemente proposti come un nuovo potenziale target di terapia in queste tipologie di linfoma. Purtroppo sviluppare un solo farmaco in grado di bloccare in modo efficiente tutte le isoforme di PIM è risultato molto difficile in quanto, nonostante la loro alta omologia, le diverse isoforme mostrano differente sensibilità allo stesso inibitore<sup>117</sup>. In questo contesto, la capacità di ITF2357 di inibire tutte e tre le isoforme di PIM, di deattivare i componenti della traduzione cap-dipendente e di promuovere l'attività inibitoria di 4EBP1 osservata in diversi istotipi di linfoma aggressivo risulta estremamente rilevante. Data la stretta dipendenza delle cellule cancerose dalla traduzione cap-dipendente, la sua inibizione ad un livello così basso, attraverso il blocco delle chinasi PIM, costituisce una strategia terapeutica estremamente vantaggiosa perché in grado rendere le cellule tumorali più sensibili all'apoptosi oltrepassando il pathway oncogenico PI3K/Akt/mTOR, che nei NHL a cellule B è molto spesso attivato in modo aberrante<sup>116</sup>. In accordo con ciò, in tutte le linee cellulari testate, ITF2357 riduce l'attività della traduzione cap-dipendente anche quando l'attività della chinasi Akt non è inibita. Comunque, è possibile solo speculare sul meccanismo attraverso cui ITF2357 inibisce l'attività delle chinasi PIM anche se tutti i meccanismi che controllano l'espressione di queste chinasi sono un bersaglio dell'ITF2357. Infatti, la sintesi proteica delle chinasi PIM richiede l'attivazione del complesso di traduzione cap-dipendente, la loro stabilità richiede la presenza di *chaperone* molecolari, mentre la loro down-regolazione necessita l'espressione di microRNA<sup>117</sup>. In questo progetto, è stato chiaramente dimostrato che ITF2357 è in grado di inibire la traduzione cap-dipendente e modificare il profilo di espressione dei micro RNA, mentre l'inibizione dell'attività della *chaperone* HSP90 in seguito all'inibizione degli HDAC risulta estensivamente descritta in letteratura<sup>121</sup>. Pertanto, questi dati forniscono un'iniziale spiegazione circa il meccanismo d'azione attraverso cui ITF2357 blocca le chinasi PIM e suggeriscono che le difficoltà riportate nello sviluppare un inibitore specifico di tutte e tre le isoforme possono essere facilmente superate utilizzando un pan-inibitore delle HDAC, il quale è già disponibile in clinica<sup>122</sup>.

In conclusione, nel contesto dei B-NHL c-Myc positivi, ITF2357 è in grado di indurre la down-modulazione a livello post-trascrizionale della proteina c-Myc, la quale è strettamente associata ad una significativa attività antitumorale. Questi dati, comunque, non escludono che ITF2357 possa avere un'attività anti-neoplastica anche in altre tipologie di tumori, considerando che la moltitudine degli effetti indotti dagli HDAC inibitori dipende strettamente dal contesto biologico in cui si trovano ad agire.

Nonostante i meccanismi attraverso cui ITF2357 induce in modo consistente l'espressione dei micro RNA Let-7a e miR-26a, e inibisce le chinasi PIM così come la traduzione cap-dipendente in modelli di B-NHL c-Myc positivi non siano pienamente chiariti, l'opportunità di indurre tutti questi effetti utilizzando un singolo farmaco può rappresentare un grande vantaggio dal punto di vista terapeutico. In linea con questa affermazione, i risultati ottenuti forniscono chiare evidenze che ITF2357 può incrementare significativamente l'attività antitumorale *in vivo* della ciclofosfamide somministrata a basse dosi in modelli *murini* xenotrapiantati con due linee cellulari di linfoma di Burkitt, mostrando un chiaro vantaggio terapeutico rispetto al trattamento con la chemioterapia convenzionale.

Complessivamente, i dati ottenuti da questo progetto indicano che ITF2357 può costituire un valido contributo alla chemioterapia convenzionale anti-linfoma per il trattamento dei linfomi B-NHL c-Myc positivi, i quali generalmente sono associati ad una prognosi non favorevole. I risultati provvedono anche a fornire il razionale per una possibile valutazione dei vantaggi terapeutici forniti dall'utilizzo di ITF2357 in combinazione con l'ampia varietà di nuovi agenti farmacologici in grado di interferire con il *pathway* PI3K/Akt/mTOR, che promuove considerevolmente la linfomagenesi guidata da c-Myc.

## BIBLIOGRAFIA

1. Slack GW, Gascoyne RD. **MYC and aggressive B-cell lymphomas.** Adv Anat Pathol. 2011 May;18(3):219-28.
2. Johnson A, Slack W, Savage J, Connors M et al. **Concurrent expression of MYC and BCL2 in Diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone.** J Clin Oncol. 2012 Oct;30(28):3452-9.
3. Boxer LM, Dang CV. **Translocations involving c-myc and c-myc function.** Oncogene. 2001 Sep 10;20(40):5595-610.
4. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, et al. **Burkitt's lymphoma.** Lancet. 2012 Mar 31;379(9822):1234-44.
5. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. **Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab.** Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 Jul 10;28(20):3360-5.
6. Cuccuini W, Briere J, Mounier N, Voelker HU, Rosenwald A, Sundstrom C, et al. **MYC+ diffuse large B-cell lymphoma is not salvaged by classical R-ICE or R-DHAP followed by BEAM plus autologous stem cell transplantation.** Blood. 2012 May 17;119(20):4619-24.
7. Hartmann E, Fernandez V, Moreno V, Valls J, Hernandez L, Bosch F, et al. **Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.** Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008 Oct 20;26(30):4966-72.
8. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M, **MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas.** Blood Aug;80(3):758-67
9. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. **Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis.** Nat Genet. 2008 Jan;40(1):43-50.
10. Kurland JF, Tansey WP. **Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase.** Cancer research. 2008;68:3624-9.
11. Zhang X, Zhao X, Fiskus W, Lin J, Lwin T, Rao R, et al. **Coordinated Silencing of MYC-Mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a Therapeutic Target of Histone Modification in Aggressive B-Cell Lymphomas.** Cancer cell. 2012 Oct 16;22(4):506-23.
12. Zhang X, Chen X, Lin J, Lwin T, Wright G, Moscinski LC, et al. **Myc represses miR-15a/miR-16-1 expression through recruitment of HDAC3 in mantle cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas.** Oncogene. 2012 Jun 14;31(24):3002-8
13. Klapproth K, Wirth T. **Advances in understanding of MYC-induced lymphomagenesis.** Br J Haematol. 2010 May;194(4):484-97.
14. Pelegaris S, Khan M, Evan G. **C-Myc: more than just a matter of life and death.** Nature 2002 Oct;2(10):764-76.
15. Blackwood E, Einsman R. **Max : a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA binding domain.** Science 1991 Mar8;251(4998): 1211-7
16. Amati B, Brooks MW, Levy N et al. **Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max.** Cell 1993 Jan 29;72(2):233-45
17. Kanazawa S, Soucek L, Evan G, Okamoto T et al. **C-MYC recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis.** Oncogene 2003 Aug;22(36):567-11.
18. Kim SY, Herbst A, Tworkowsky KA, Salghetti SE, Tansey WP. **Skp2 regulates Myc protein stability and activity.** Mol Cell 2003 May;11(5):1177-88
19. Gargano B, Amente S, Majello B, Laina L. **P-TEFb is crucial co-factor for Myc transactivator.** Cell Cycle 2007 Aug15;6(16):2031-7.

20. Wu S, Cetinkaya C et al. **Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter.** *Oncogene* 2003 22;351-360
21. Sander S, Bullinger L, Klapproth K, Fiedler K, Kestler HA, Barth TF, et al. **MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a.** *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4202-12
22. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. **MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells.** *Cancer research*. 2007 Oct 15;67(20):9762-70.
23. Lin CJ, Cencic R, Mills JR, Robert F, Pelletier J. **c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation.** *Cancer research*. 2008 Jul 1;68(13):5326-34.
24. Sonenberg N, Hinnebusch AG. **Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets.** *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):731-45.
25. Junttila MR, Westermarck J. **Mechanism of MYC stabilization in human malignancies.** *Cell Cycle* Mar 1;7(57):592-6
26. Bahram F, von der Lehr N, Cetinkaya C, Larsson LG. **c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover.** *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):2104-10.
27. Berns K, Hijmans M, Bernards R. **Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells cause G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity.** *Oncogene* 1997 (15);1347-1997.
28. Ellers M, Elsenman RN, **Myc's broad reach.** *Genes Dev*. 2008 Oct 15;22(20):2755-66.
29. Bouchard C et al. **Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27.** *EMBO J*. 1999; (18);5321-5333.
30. Hermeking H et al. **Identification of CDK4 as a target of c-MYC.** *PNAS USA* 2000 (97) 2229-2234.
31. O'Hagan RC et al. **Myc enhanced expression of Cul1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression.** *Genes Dev*. 2000 (14); 2651-2576.
32. Morrish F, Neretti N, Sedivy JM, Hockenbery DM. **The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry.** *Cell Cycle* 2008 Apr 15;7(8):1054-66
33. Hueber A et al **Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc induced apoptosis.** *Science* 1997: 278, 1305-1309
34. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T et al. **Myc signaling via ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization.** *Genes Dev* 1998 Aug 1;12(15):2424-33
35. Bouchard C, Lee S, Paulus-Hock V et al. **FoxO transcription factor suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf.** *Genes Dev* 2007 Nov 1;21(21):2775-87
36. Wilda M, Bruch J, Harder L et al. **Inactivation of the ARF-MDM2-p53 pathway in sporadic Burkitt lymphoma in children.** *Leukemia* 2004 Mar;18(3):584-8
37. Pusapati RV, Rounbehler RJ, Hong S et al. **ATM promotes apoptosis and suppress tumorigenesis in response to Myc.** *PNAS* 2006. 103; 712-717
38. Juin P, Hueber A, Littlewood T, Evan G. **c-Myc induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release.** *Genes Dev* 1998, 13: 1367-1381.
39. Soucie L et al. **Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria.** *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4725-4736
40. Lawrie CH. **MicroRNAs and haematology: small molecules big function.** *Br J Haematol* 2007 Jun; 137(6):503-12
41. He L, Thomson JM, Haemann MT, Hernando-Monge E, Mu D et al. **A microRNA polycistron as a potential human oncogene.** *Nature* 2005 Jun 9;435(7043):828-33

42. Tagawa H, Seto M **A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma.** *Leukemia* 2005 Nov;19(11):2013-6
43. Inomata M, Tagawa H, Guo YM, Takahashi N, Sawada K. **MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct target in different B-cell lymphoma subtypes.** *Blood* 2009 Jan 8;113(2):396-402.
44. O'Donnel KA, Wentzel EA, Zeller KI et al **c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression.** *Nature* 2005 Jun 9; 435(7043):839-43
45. Olive V, Nennett MJ, Walker JC et al **miR19 is a key oncogenic component of miR-17-92.** *Genes Dev* 2009 Dec 15;23(24):2839-49
46. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E et al **Transcriptional activation of miR34a contributes to p53-mediated apoptosis** *Mol Cell* 2007 8;26(5): 731-43.
47. Robertus JL, Kluiver J, Waggemans C et al. **MiRNA profiling in B-non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma.** *Br J Haematol.* 2010 Jun;149(6):896-9.
48. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS et al **c-Myc suppression of miR23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism.** *Nature* 2009 Apr 9;458(7239):762-5
49. Vennstrom B, Sheiness D, Zabielsky J et al. **Isolation and characterization of c-Myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29.** *J Virol* 1991; 42:773-9.
50. Harris AW, Pinkert CA, Crawford M, Langdon WY, Brinster RL, Adams JM. **The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells.** *The Journal of experimental medicine.* 1988 Feb 1;167(2):353-71.
51. Smith SM, Anastasi J, Cohen KS, Godley LA. **The impact of MYC expression in lymphoma biology: Beyond Burkitt lymphoma.** *Blood Cell Mol Dis* 2010 Dec15;45(4):317-23.
52. Kupper R, **Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis.** *Nature reviews. Cancer.* 2005; 5: 251-262.
53. Brack C, Hiramama M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. **A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination.** *Cell.* 1978;15(1):1-14.
54. Rajewsky K. **Clonal selection and learning in the antibody system.** *Nature.* 1996;381(6585):751-758.
55. Batista FD, Harwood NE. **The who, how and where of antigen presentation to B cells.** *Nature reviews. Immunology.* Jan 2009;9(1):15-27.
56. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. **BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control.** *Immunity.* Aug 2000;13(2):199-212
57. Klein U, Casola S, Cattoretti G, et al. **Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination.** *Nature Immunology.* Jul 2006; 7(7): 773-782.
58. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. **Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program.** *Immunity.* Jul 2002; 17(1): 51-62.
59. Küppers R, Dalla-Favera R. **Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas.** *Oncogene.* 2001; 20: 5580-5594
60. Fujita S, Buziba N, Kumatori A, Senba M, Yamaguchi A, Toriyama K. **Early stage of Epstein-Barr virus lytic infection leading to the "starry sky" pattern formation in endemic Burkitt lymphoma** *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 549-52.
61. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. **Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Sep 9 2008;105(36):13520-13525.
62. Lenz G, Nagel I, Siebert R, et al. **Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large**

- B cell lymphoma.** The Journal of experimental medicine. Mar 19 2007;204(3):633-643.
63. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. **Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells.** The Journal of experimental medicine. Dec 17 2001;194(12):1861-1874.
  64. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. **Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma.** *Nature.* Jan 7 2010;463(7277):88-92.
  65. Jenuwein T, Allis CD. **Translating the histone code.** Science 2001 Aug 10;293(5532):1074-80
  66. Minucci S, Pellicci PC, **Hystone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic(and more treatments) for cancer.** Nat Rev Cancer 2006 Jan6;(1):38-51
  67. Mercurio C, Minucci S, Pellicci PG. **Histone deacetylase and epigenetic therapies of haematological malignancies** Pharmacol Res 2010 Jul 62(1):18-34.
  68. Caron C, Boyalt C, Khocbin S. **Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability.** Bioassays 2005 Apr;27(4):408-15.
  69. Yaun ZL, Guan YJ, Chatterie D, Chin YE **Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue.** Science 2005 Jan14; 307(5707);269-73.
  70. Wang R, Cherukuri P, Luo J **Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB binding mediated acetylation** J Biol Chem Mar 25;280(12) 11528-34
  71. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK et al **Regulation and destabilization of HIF1alpha by ARDI-mediated acetylation** Cell 2002 Nov 27;111(5):709-20.
  72. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B et al **Acetylation of the C-terminus of Ku-70 by CBP and PCAF control Bax-mediated apoptosis.** Mol Cell 2004 Mar 12;13(5):627-38.
  73. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A et al **Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion** EMBO J 2003 OCT 15,22(20):5551-60.
  74. Bode AM, Dong Z **Post-translation modification of p53 in tumorigenesis.** Nat Rev Cancer 2004 OCT;4(10):793-805
  75. Chen LF , Greene WC. **Shaping the nuclear action of NF-kB** Nat Rev Mol Cell Biol 2004 May (5(5):392-401
  76. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM et al **The deacetylase HDAC6 regulates aggressome formation and cell viability in response to misfolded protein stress.** Cell 2003 Dec 12;115(6):727-38.
  77. Minucci S, Nervi C et al. **Histone deacetylase: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias ?** Oncogene 2001. May 20;3110-3115
  78. He LZ, Tolentino T. et al. **Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy resistant acute promyelocytic leukemia.** J Clin Invest 2001;108 November 9; 1321-1330.
  79. Wang J, Hoshito T et al. **ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex.** PNAS USA1998. Sept;(18);0860-10865.
  80. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H et al **Molecular pathogenesis of Non-Hodgkin's limphoma: role of Bcl-6.** Leukemia & Lymphoma 2003
  81. Lamercier C, Brocard MP et al. **Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL-6 transcriptional repressor.** J Biol Chem 2002 Jun 14;277(24):22045-52
  82. Gomez-Curet I, Perkins RS, Bennett R, Feidler KL, Dunn SP, Krueger LJ. **c-Myc inhibition negatively impacts lymphoma growth.** J Pediatr Surg. 2006 Jan;41(1):207-11; discussion -11.

83. Kirschbaum et al. **Phase 2 study of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma: A California Cancer Consortium study.** ASCO 2007, Abstract 18515
84. Oki Y, Buglio D, Fanale M, Fayed M, Fayad L, Copland A et al. **Phase I study of Panobinostat plus Everolimus in patient with relapsed or refractory Lymphoma.** Cancer Res 2013 Dec 15;19(24):6882-90.
85. Reimer P, Chawia S. **Long-term complete remission with belinostat in patient with chemotherapy refractory peripheral T-cell lymphoma.** J Haematol Oncol 2013 Sept 10;6:69
86. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, et al. **FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases.** Cancer Research. Sep 1 2002; 62(17): 4916-4921.
87. Pierkarz RL, Frie R, Turner M, **Phase II multi-institutional trial of histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma** Journal of Clinical oncology Nov 10 2009;27(32):5410-5427
88. Gottlicher M, Minucci S et al **Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells** The EMBO Journal. Dec 17 2001 ;20(24):696978.
89. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. **Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation.** Proc Natl Acad Sci USA 2000;97 Aug(18):10014-9.
90. Insigna A et al **Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway.** Nature Med 2005 11:71-76
91. Carlisi D, Lauricella M, D'anneo A et al. **The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to Trail induced apoptosis by TRAIL-DISC activation.** Eur J Cancer 2009;45 2425-38
92. Inoue S, Harper N, Walewska R et al. **Enhanced Fas associated death domain recruitment by histone deacetylase inhibitors is critical for the sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to TRAIL induced apoptosis** Mol Cancer Ther 2009;8:3088-97
93. Zhang XD, Gillespie SK, Borrow JM, Hersey P. **The histone deacetylase inhibitors suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells.** Mol Cancer Ther 2004 April(4):425-35.
94. Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, et al. **The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species.** Proc Natl Acad Sci USA 2001;98 September(19):10833-8.
95. Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, et al. **Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling.** Oncogene. Jan 17 2002; 21(3): 427-436.
96. Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. **Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion.** Cancer Research. Jun 15 2003; 63(12):3069-3072.
97. Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, et al. **Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors.** Journal of immunology. Dec 15 2000; 165(12): 7017-7024
98. Maeda, T., Towatari, M., Kosugi, H. & Saito, H. **Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells.** Blood 96, 3847-3856 (2000).
99. Lewis TS, McCormick RS, Stone IJ, Emmerton K, Mbow B, Miyamoto J, et al. **Proapoptotic signaling activity of the anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab circumvents multiple oncogenic transformation events and**

- chemosensitizes NHL cells.** *Leukemia* : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK. 2011 Jun;25(6):1007-16.
100. Felsher DW, Bishop JM. **Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages.** *Molecular cell.* 1999 Aug;4(2):199-207.
101. Gomez-Curet I, Perkins RS, Bennett R, Feidler KL, Dunn SP, Krueger LJ. **c-Myc inhibition negatively impacts lymphoma growth.** *J Pediatr Surg.* 2006 Jan;41(1):207-11; discussion -11.
102. Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA, et al. **Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011 Oct 4;108(40):16669-74.
103. Roderick JE, Tesell J, Shultz LD, Brehm MA et al. **C-Myc inhibition prevents leukemia initiation in mice and impairs the growth of relapsed and induction of pediatric T-ALL cells.** *Blood* 2013 Jan 6
104. Zhu C, Chen Q, Xie Z, Ai J, Tong L, Ding J, et al. **The role of histone deacetylase 7 (HDAC7) in cancer cell proliferation: regulation on c-Myc.** *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2011;89:279-89.
105. Seo SK, Jin HO, Woo SH, Kim YS, An S, Lee JH, et al. **Histone deacetylase inhibitors sensitize human non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation through acetyl p53-mediated c-myc down-regulation.** *J Thorac Oncol.* 2011 Aug;6(8):1313-9.
106. Kretzner L, Scuto A, Dino PM, Kowolik CM, Wu J, Ventura P, et al. **Combining Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat with Aurora Kinase Inhibitors Enhances Lymphoma Cell Killing with Repression of c-Myc, hTERT, and microRNA Levels.** *Cancer research.* 2011;71:3912-20.
107. Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M. **HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression.** *Genes & development.* 2009;23:1743-8
108. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. **Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells.** *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1102-7.
109. Kong YW, Cannell IG, de Moor CH, Hill K, Garside PG, Hamilton TL, et al. **The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008 Jul 1;105(26):8866-71.
110. Sander S, Bullinger L. **Repressing the repressor: a new mode of MYC action in lymphomagenesis.** *Cell cycle.* 2009;8:556-9.
111. Sampath D, Liu C, Vasan K, Sulda M, Puduvali VK, Wierda WG, et al. **Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood.* 2012 Feb 2;119(5):1162-72
112. Schatz JH, Oricchio E, Wolfe AL, Jiang M, Linkov I, Maragulia J, et al. **Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma.** *The Journal of experimental medicine.* 2011;208.
113. Zhang Y, Wang Z, Li X, Magnuson NS. **Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation.** *Oncogene.* 2008 Aug 14;27(35):4809-19.
114. Kumar A, Marques M, Carrera AC. **Phosphoinositide 3-kinase activation in late G1 is required for c-Myc stabilization and S phase entry.** *Molecular and Cellular Biology.* 2006 Dec;26(23):9116-25.
115. Zippo A, De Robertis A, Serafini R, Oliviero S. **PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation.** *Nat Cell Biol.* 2007 Aug;9(8):932-44.
116. Sander S, Calado DP, Srinivasan L, Kochert K, Zhang B, Rosolowski M, et al. **Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis.** *Cancer cell.* 2012 Aug 14;22(2):167-79
117. Nawijn MC, Alendar A, Berns A. **For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis.** *Nature reviews Cancer.* 2011;11:23-34

118. Lin CJ, Nasr Z, Premrirut PK, Porco JA, Jr., Hippo Y, Lowe SW, et al. **Targeting Synthetic Lethal Interactions between Myc and the eIF4F Complex Impedes Tumorigenesis.** Cell Rep. 2012 Apr 19;1(4):325-33.
119. Gomez-Abad C, Pisonero H, Blanco-Aparicio C, Roncador G, Gonzalez-Menchen A, Martinez-Climent JA, et al. **PIM2 inhibition as a rational therapeutic approach in B-cell lymphoma.** Blood. 2011 Nov 17;118(20):5517-27.
120. Hsi ED, Jung SH, Lai R, Johnson JL, Cook JR, Jones D, et al. **Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study.** Leuk Lymphoma. 2008 Nov;49(11):2081-90.
121. Rao R, Fiskus W, Yang Y, Lee P, Joshi R, Fernandez P, et al. **HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells.** Blood. 2008 Sep 1;112(5):1886-93
122. Furlan A, Monzani V, Reznikov LL, Leoni F, Fossati G, Modena D, et al. **Pharmacokinetics, safety and inducible cytokine responses during a phase 1 trial of the oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 (givinostat).** Mol Med. 2011 May-Jun;17(5-6):353-62.
123. Gomez-Curet I, Perkins RS, Bennett R, Feidler KL, Dunn SP, Krueger LJ. **c-Myc inhibition negatively impacts lymphoma growth.** J Pediatr Surg. 2006 Jan;41(1):207-11; discussion -11.

## TABELLE SUPPLEMENTARI

**TABELLA 1**

Drug <sup>a</sup>	Dose (mg/kg)	Schedule	Namalwa			Raji		
			Max TWI% <sup>b</sup> (day)	Tox/Tot <sup>c</sup> (day)	CR <sup>d</sup>	MaxTWI% <sup>b</sup> (day)	Tox/Tot <sup>c</sup> (day)	CR <sup>d</sup>
ITF2357	50	qdx5/wx6w	42.7 (24)	0/7	0/7	50.6 (35)	0/8	0/8
CTX	75	q7dx3	99.6 (24)	0/7	1/7	98.6 (39)	2/8	0/8
CTX	50	q7dx3	97.8 (17)	0/7	0/7	95.4 (39)	0/8	0/8
ITF2357	50	qdx5/wx6w	99.9 (24)	0/7	4/7	99.2 (39)	0/8	5/8
+CTX	50	q7dx3						

<sup>a</sup>CTX è stata risospesa in soluzione salina, ITF2357 è stato risospeso in DMSO, cremofor e PBS in rapporto 10:5:85

<sup>b</sup>MaxTWI, percentuale massima di inibizione; tra parentesi giorni dopo l'inoculo

<sup>c</sup>Tox/Tot, nessun animale del gruppo di controllo è deceduto prima rispetto ai gruppi trattati

<sup>d</sup>CR, remissioni complete della durata minima di una settimana.