

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche Umane e Molecolari

Settore Disciplinare BIO/16

Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e

Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore

**VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE INOSITIDE-
DIPENDENTE COME BERSAGLIO TERAPEUTICO NEL
TRATTAMENTO DELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE**

Tesi di Dottorato

Tutore:

CHIAR.MA PROF.SSA LUCIA MANZOLI

Presentata da:

DOTT.SSA SARA MONGIORGI

Coordinatore

CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

XXI Ciclo

Anno Accademico 2007/2008

INDICE

Introduzione

1. Sindromi Mielodisplastiche (MDS)	2
1.1. Trattamento delle MDS: Azacitidina	6
2. Asse di Attivazione Fosfoinositide-3-Chinasi (PI3K)/Akt	9
Isoforme di Akt	11
Ruolo di PI3K/Akt nei Disordini Ematopoietici	12
Ruolo di Akt nei Meccanismi Apoptotici	13
Ruolo di Akt nella Progressione attraverso il Ciclo Cellulare	14
3. Target Molecolari a Valle di Akt: mTOR, 4E-BP1 e p70S6K	15
4. Signalling Inositide-Dipendente: Fosfolipasi $\text{c}\beta 1$ (PI-PLC $\beta 1$)	17
Struttura del Gene della PI-PLC $\beta 1$	18
Struttura Proteica della PI-PLC $\beta 1$	19
Ruolo della PI-PLC $\beta 1$ nei Disordini Ematopoietici	21

Scopo della Ricerca	22
----------------------------	-----------

Materiali e Metodi

1. Colture Cellulari <i>in vitro</i>	24
2. Caratteristiche dei Pazienti	24
3. Separazione delle Cellule Mononucleate	24
4. Analisi Immunocitochimica	26
5. Separazione delle Cellule CD33+	27
6. Analisi Citofluorimetrica per la Quantificazione dell'Apoptosi	29
7. Analisi Citofluorimetrica per l'Analisi del Fenotipo	29
8. Separazione delle Cellule CD34+	30
9. Saggio Clonogenico	30
10. Preparazione del Lisato Proteico Totale	31
11. Western Blotting	32
12. Studio della presenza di Isole CpG nel Promotore Putativo del gene della PI-PLC $\beta 1$	34
13. Estrazione del DNA ed Analisi Mutazionale	35

14. Sulfonazione del DNA	35
15. Real-Time PCR Metilazione-Specifica (MSP) con Sybr Green	35
16. Estrazione dell'RNA e Sintesi del cDNA	36
17. Real-Time PCR con Sonde TaqMan	37
18. Clonaggio dell'Isola 2 CpG del Promotore del Gene della PI-PLC β 1	37
18.1. Amplificazione del Frammento dell'Isola 2 del promotore del Gene della PI-PLC β 1	37
18.2. Colture Batteriche	38
18.3. Ligasi di un Frammento di DNA in un Plasmide	38
18.4. Trasformazione di una Coltura Batterica	40
18.5. Lisi Alcalina per l'Estrazione del DNA Plasmidico da Batteri	40
18.6. Digestione del DNA Plasmidico con Enzimi di Restrizione	40
18.7. Purificazione del DNA Plasmidico	40
18.8. Metilazione in vitro	41
18.9. Trasfezione e Saggio della Fosfatasi Alcalina	41
18. Saggio MTT	41

Risultati

1. Studio della Specificità degli Anticorpi della via di Trasduzione del Segnale Akt/mTOR mediante Analisi Immunocitochimica e Western Blotting su Linee Cellulari	43
2. Studio dell'Espressione Proteica di Akt nelle MDS mediante Analisi Immunocitochimica	44
3. Studio dell'Espressione Proteica di alcuni bersagli Molecolari a valle di Akt mediante Analisi Immunocitochimica: asse di Attivazione mTOR / 4E-BP1/ p70S6K nelle MDS	47
4. Analisi dell'Espressione di Akt e mTOR ni Lineare Differenziativi Mieloide ed Eritroide	49
5. La Rapamicina induce Apoptosi nelle Cellule CD33+ nelle MDS ad alto Rischio	50
6. Saggio Clonogenico su Cellule CD34+ derianti da Donatori Sani e Pazienti affetti da MDS	53
7. Studio del Fenotipo di Akt nelle MDS mediante Analisi al Citofluorimetro in un Paziente affetto da MDS in seguito a Trattamento con Azacitidina	54
8. Espressione Genica delle Forme Trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b in un Paziente affetto da MDS ad Alto Rischio in seguito a Trattamento con Azacitidina	55
9. Studio dell'Espressione Proteica di Akt e PI-PLC β 1, mediante Analisi Immunocitochimica, in un Paziente affetto da MDS in seguito a Trattamento con Azacitidina	58
10. Caratteristiche dei Pazienti deloo Studio sulla Metilazione	60

11. Presenza di Isole CpG nel Promotore Putativo del Gene della PI-PLC β 1	61
12. Livelli di Metilazione delle Isole CpG nel Promotore del gene della PI-PLC β 1	61
13. Stato della Metilazione delle Isole CpG nel Promotore della PI-PLC β 1 nelle Linee Cellulari	62
14. Saggio di Proliferazione Cellulare per la Determinazione della Concentrazione non Citotossica dell'Azacitidina nei Trattamenti delle Linee Cellulari	63
15. Analisi della Variazione dello Stato di Metilazione e dell'Espressione Genica della PI-PLC β 1 in seguito a Trattamento con Azacitidina	63
16. Saggio di Attività della Fosfatasi Alcalina in seguito a Clonaggio dell'Isola CpG 2 nel Vettore pSEAP2-Basic	64
17. Valutazione dello Stato di metilazione dell'Isola 2 CpG e della Trascrizione Genica dell'Isoforma b della PI-PLC β 1 nei Pazienti affetti da MDS	66
Discussione	69
Bibliografia	75

INTRODUZIONE

1. SINDROMI MIELODISPLASTICHE (MDS)

Le Sindromi Mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo eterogeneo di malattie clonali del sistema emopoietico che interessano tipicamente, ma non esclusivamente, soggetti al di sopra dei 60 anni di età. Le MDS sono caratterizzate da una progressiva incapacità di maturazione delle cellule staminali emopoietiche; a seconda del livello di differenziamento coinvolto, tali malattie si presentano quindi sottoforma di anemia, neutropenia, con problemi di sanguinamento ed infezioni. Tuttavia, i soggetti affetti non presentano una grave sintomatologia, pur essendo a rischio di progressione in leucemia mieloide acuta (AML).

Dal punto di vista istologico, le MDS sono suddivise secondo la classificazione F.A.B. (French-American-British), basata sul numero e la morfologia dei blasti presente nel sangue midollare al momento della diagnosi (Bennett et al., 1982), che definisce cinque sottotipi principali di MDS: anemia refrattaria (RA), anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS), anemia refrattaria con eccesso di blasti (RAEB), anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione (RAEB-t), e leucemia mielomonocitica cronica (CMML), come mostrato in Tabella 1 e in Figura 1. A tale classificazione è stata recentemente aggiunta la classificazione WHO (World Health Organization), che raggruppa le MDS in otto categorie, come mostrato in Tabella 2 (Germing et al., 2000) (Vardiman et al., 2002). Inoltre, mediante l'uso del fattore IPSS (International Prognostic Scoring System) si può effettuare una valutazione prognostica, che si basa sulla combinazione delle aberrazioni cromosomiche, la presenza di citopenia e l'età del paziente (Greenberg et al., 1997); secondo questo sistema, i pazienti sono suddivisi in quattro categorie, dal basso rischio all'alto rischio di evoluzione in AML, come mostrato nella Tabella 3.

È possibile che alterazioni citogenetiche, sia numeriche che strutturali, caratterizzino le MDS; l'incidenza di aberrazioni cromosomiche è di circa il 30-50% nelle MDS primarie e dell'80% nelle MDS secondarie, provocate da lunghe esposizioni ad agenti mutageni.

Normalmente, circa il 70% di tutti i pazienti affetti da MDS presenta una buona prognosi, ma nel 30% dei casi si ha una crisi blastica ed una rapida evoluzione in AML. Tra i pazienti che evolvono in AML, circa il 25-30% possiede un cariotipo normale, che attualmente rimane un fattore prognostico positivo, mentre il restante 70% presenta un cariotipo alterato, che è un fattore prognostico negativo. Infatti, circa il 50% dei pazienti ad alto rischio di evoluzione in AML possiede delezioni parziali o totali del cromosoma 7, oppure trisomia del cromosoma 8. Inoltre, sono state riscontrate frequenti perdite alleliche a livello dei cromosomi 6q, 7p, 10p, 11q, 14q e 20q (Alvarez and Cigudosa, 2005; Mori et al., 2000).

Per quanto riguarda il gruppo di pazienti affetti da MDS a cariotipo normale, attualmente il loro trattamento rappresenta un problema, poiché recentemente è stato visto che il *follow-up* clinico non

è sufficiente a prevenire l'insorgenza di forme di AML molto aggressive (Trost et al., 2004). Sarebbe quindi molto importante avere a disposizione strumenti efficaci per identificare con maggior sicurezza i pazienti ad alto rischio di evoluzione in AML. Complessivamente, i meccanismi molecolari che inducono l'evoluzione in AML nei pazienti affetti da MDS non sono ancora stati chiariti. In particolare, ad oggi, per le MDS non esistono marcatori genetici specifici che possano essere utilizzati come strumenti per la diagnosi o la prognosi dei soggetti affetti da questa patologia.

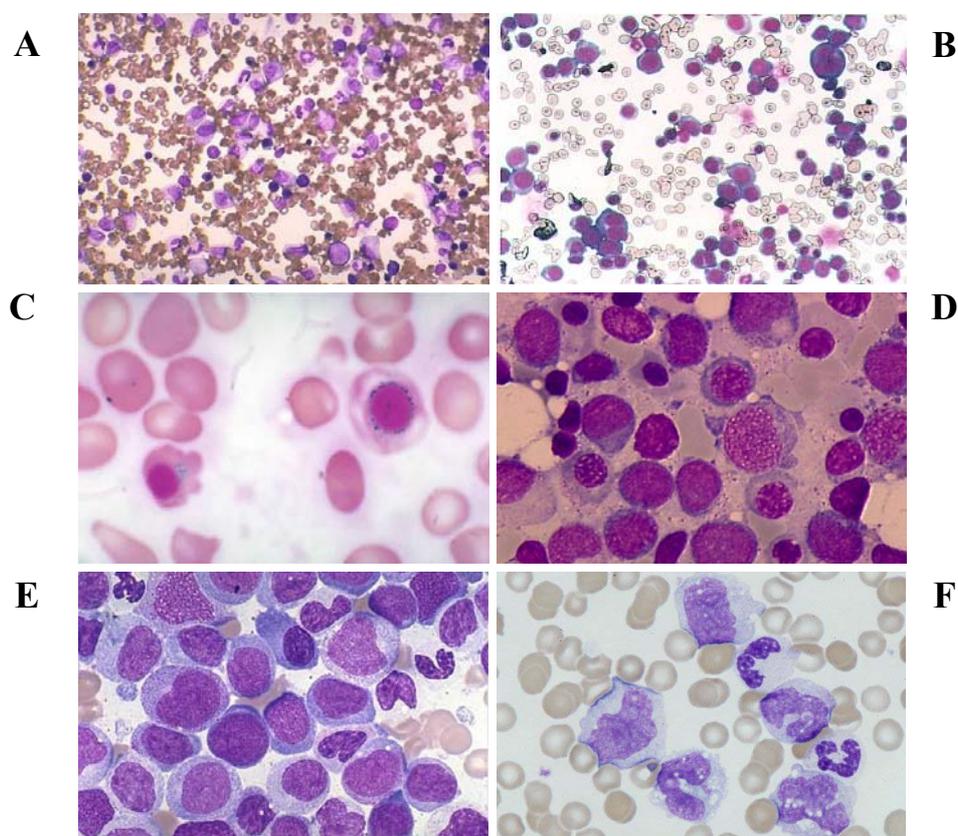


Figura 1. Morfologia dei blasti nelle MDS. (A) Midollo osseo normale. (B) Anemia refrattaria o RA. (C) Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello o RARS. (D) Anemia refrattaria con eccesso di blasti o RAEB. (E) Anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione o RAEB-T. (F) Leucemia mielomonocitica cronica o CM.

Tabella 1. Classificazione F.A.B. delle MDS

Sottotipo	Sangue periferico	Sangue midollare	Diagnosi MDS in %
Anemia refrattaria	≤1% blasti	< 5% blasti <15% sideroblasti ad anello	10-40
Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello	≤1% blasti	< 5% blasti ≥15% sideroblasti ad anello	10-35
Anemia refrattaria con eccesso di blasti	< 5% blasti	5-19% blasti	25-30
Anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione	≥ 5% blasti o cellule di Auer	20-29% blasti o cellule di Auer	10-30
Leucemia mielomonocitica Cronica	< 5% blasti >1x10 ⁹ /L monociti	≤ 20% blasti	10-20

Tabella 2. Classificazione WHO delle MDS

RA	Anemia Blasti < 1% Monociti < 1000/mm ³	Blasti < 5% Sideroblasti ad anello < 15%
RARS	Anemia Blasti < 1% Monociti < 1000/mm ³	Blasti < 5% Sideroblasti ad anello ≥ 15%
RCMD	Citopenia (bi- o pancitopenia) Blasti < 1% Monociti < 1000/mm ³	Displasia ≥ 10% delle cellule Blasti < 5% Sideroblasti ad anello < 15%
RCMD-RS	Citopenia (bi- o pancitopenia) Blasti < 1% Monociti < 1000/mm ³	Displasia ≥ 10% delle cellule Blasti < 5% Sideroblasti ad anello ≥ 15%
RAEB-I	Citopenia Blasti < 5% Monociti < 1000/mm ³	Displasia multilineage Blasti 5% - 9%
RAEB-II	Citopenia Blasti 5% - 19% Monociti < 1000/mm ³ Cellule di Auer ±	Displasia multilineage Blasti 10% - 19% Cellule di Auer ±
MDS-U	Citopenia Blasti < 1%	Displasia unilineage Blasti < 5%
MDS, con del(5q) isolata	Anemia Blasti < 5% Piastrine normali o aumentate	Blasti < 5% del (5q) isolata Megacariociti normali o aumentati

* Abbreviazioni: **RA**, anemia refrattaria; **RARS**, RA con sideroblasti ad anello;
RCMD, citopenia refrattaria con displasia multilineage;
RCMD-RS, RCMD con sideroblasti ad anello;
RAEB-I e RAEB-II, RA con eccesso di blasti (I e II);
MDS-U, MDS non classificabile

Tabella 3. Classificazione IPSS delle MDS

Categorie di rischio IPSS	Punteggio prognostico [♦]	Blasti midollari	Cariotipo
Low	0 (5.7 anni)	< 5%	Normale [†] oppure del 5q, del 20q
Intermediate-I	0.5-1.0 (3.5 anni)	5-10%	Intermedio [▪]
Intermediate-II	1.5-2.0 (1.2 anni)	11-30%	Complesso* e/o anomalie del Chr 7
High	≥ 2.5 (6 mesi)	> 30%	Complesso*

[♦] Il punteggio prognostico è calcolato come somma dei singoli punteggi valutativi dei blasti midollari, della citopenia e del cariotipo. La sopravvivenza media per ogni gruppo è mostrata tra parentesi.

[†] Normale: normale oppure con -Y, del(5q) e del(20q)

* Complesso: ≥ 3 anomalie cromosomiche [▪] Intermedio: altre anomalie

1.1. TRATTAMENTO DELLE MDS: Azacitidina

Diverse strategie vengono utilizzate per il trattamento dei pazienti con MDS; i principali obiettivi terapeutici sono il miglioramento dell'emopoiesi e della qualità di vita del paziente. Terapie di supporto sono indirizzate principalmente a pazienti affetti da MDS a basso rischio (IPSS *Low*, *Intermediate-I*), mentre pazienti affetti da MDS ad alto rischio (IPSS *Intermediate-2*, *High*) necessitano di terapie più aggressive (chemioterapia aggressiva e/o trapianto di cellule staminali). Tuttavia, a causa dell'elevata età media dei pazienti con MDS, solo un terzo di questi possono essere sottoposti a trattamenti citotossici intensivi.

Il fenomeno della metilazione è stato osservato in numerose forme di cancro e potrebbe diventare uno strumento molecolare con un importante significato prognostico. Le regioni genomiche che mostrano un'alta densità di nucleotidi CG sono definite isole CpG e sono caratterizzate da una grandezza che va da 200 a 5000 coppie di basi e da una presenza di CG pari al 60-70%; spesso queste isole sono localizzate nelle regioni dei promotori dei geni e al 5'-UTR delle regioni codificanti. Nei tessuti non neoplastici i promotori metilati si trovano negli alleli silenziati in modo selettivo dei geni dell'imprinting e del cromosoma X inattivato del sesso femminile. Funzionalmente, la metilazione di queste isole è associata alla cromatina inattiva ed alla repressione della trascrizione genica (Kuendgen and Lubbert, 2008).

Il trasferimento dei gruppi metilici al DNA è catalizzato dagli enzimi DNA metiltransferasi (Figura 2): la metilazione può seguire uno schema già esistente oppure essere *de novo*, in cui qualcosa, non ancora identificato, permette la metilazione delle citosine *de novo* nei primi stadi dello sviluppo embrionale. Esistono quattro classi di DNA metiltransferasi (DNMT1, TRDMT1, DNMT3A e DNMT3B) e la più abbondante nelle cellule di mammifero è la DNMT1.

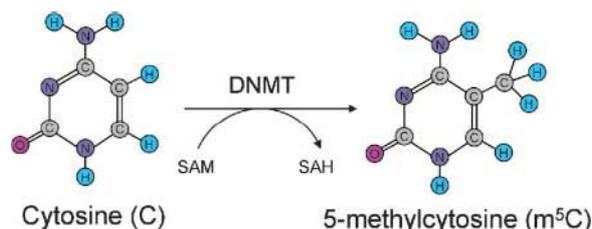


Figura 2. I residui di citosina nel DNA sono convertiti a 5-metilcitosina dalle DNA metiltransferasi (DNMT). I gruppi metilici sono donati dal donatore universale di metili che è l'S-adenosilmetionina (SAM) la quale viene così convertita a S-adenosilomocisteina (SAH).

La Azacitidina e la decitabina sono due inibitori delle DNA metiltransferasi (DNMT) che sono attualmente utilizzati nel trattamento delle MDS (Abdulhaq and Rossetti, 2007) (Soriano et al., 2007) (Garcia-Manero et al., 2006) (Kantarjian et al., 2007), oltre ad essere impiegati in protocolli sperimentali per la terapia di altre neoplasie ematologiche. Alcuni studi hanno riportato che l'utilizzo di questi farmaci ha portato il 50-80% dei casi affetti da MDS ad avere una buona risposta clinica: i pazienti trattati mostravano una minor progressione in AML e un miglioramento sia della qualità della vita che della sopravvivenza. Si pensa che trattamenti a basso regime con questi agenti demetilanti potrebbero riattivare geni coinvolti nella crescita cellulare che sono stati silenziati attraverso un meccanismo di metilazione. Infatti, nelle neoplasie mieloidi e nella leucemia linfoide acuta è risultato frequentemente ipermetilato il gene p15/INK4B e, in alcuni pazienti affetti da MDS trattati con decitabina, è stata osservata la demetilazione di questo gene (Daskalakis et al., 2002). Tuttavia, il meccanismo molecolare di tali farmaci non è ancora stato chiarito, per cui è necessario cercare altri possibili target terapeutici.

Come mostrato in Figura 3, il meccanismo d'azione della Azacitidina e di altri analoghi pirimidinici della citosina si basa sulla formazione di complessi con le DNA metiltrasferasi, portando all'inattivazione di tali enzimi. Inoltre, la Azacitidina può essere incorporata anche nell'RNA e dare origine a RNA messaggeri e *transfer* difettivi, inibendo quindi la sintesi proteica.

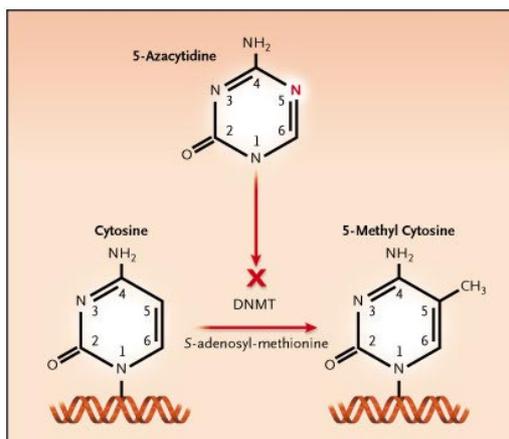


Figura 3. Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione della Azacitidina. Il farmaco agisce bloccando le DNA metil-transferasi che non riescono più a convertire la citosina in metil-citosina.

2. ASSE DI ATTIVAZIONE FOSFOINOSITIDE-3-CHINASI (PI3K)/Akt

PI3K/Akt è una via cruciale coinvolta in diversi processi fisiologici che includono: progressione attraverso il ciclo cellulare, differenziamento, trascrizione, traduzione ed apoptosi.

In molti tumori umani, componenti di questa via di trasduzione del segnale sono spesso soggetti ad aberrazioni genomiche incluse amplificazioni, mutazioni e riarrangiamenti cromosomici. L'attivazione dell'asse PI3K/Akt porta infatti ad un alterato controllo della duplicazione cellulare e dell'apoptosi, con conseguente proliferazione da parte delle cellule tumorali. E' inoltre noto che l'*up-regulation* della via PI3K/Akt può essere uno dei principali fattori in grado di ridurre l'efficacia dei trattamenti antineoplastici ed è per questo motivo che Akt è un bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Nelle cellule di mammifero esistono 3 classi di chinasi lipidiche PI3K, ognuna delle quali presenta caratteristiche diverse in termini di struttura molecolare e specificità di substrato (Figura 4).

La classe I è quella maggiormente studiata, in quanto è collegata a stimoli extracellulari, come i fattori di crescita e le citochine (Martelli et al., 2005a). Infatti, in seguito al legame, a livello dei recettori di membrana, di diversi fattori di crescita e citochine, la PI3K localizzata a livello della membrana fosforila il PIP₂ trasformandolo in PIP₃, che a sua volta attiva numerosi substrati a valle (Figura 5). La classe I è ulteriormente suddivisa in due sottoclassi:

1. IA, che è composta da una subunità catalitica di 110 kDa e da una subunità adattatrice/regolatrice. Quest'ultima ha la funzione di localizzare la PI3K a livello della membrana, attraverso l'interazione dei domini *src homology-2* (SH2) con i residui di fosfotirosina dei recettori attivati (Martelli et al., 2005a).
2. IB, che è composta da una subunità catalitica di 110 kDa ed una regolatoria di 101 kDa (Martelli et al., 2005a).

Le PI3K di classe I sono molecole-chiave della segnalazione intracellulare, che integrano una grande varietà di segnali attivati da alcuni fattori di crescita polipeptidici, i quali, legandosi a recettori specifici ne guidano l'attivazione in modo diretto, mediante treonin-chinasi, proteine G eterotrimeriche o RAS. Il substrato preferito delle PI3K di classe I è il PIP₂ che viene trasformato in PIP₃. Le PI3K di classe I sono eterodimeri composti da una subunità catalitica p110 e da una subunità con funzione di regolatore/adattatore (p85 o p55), la quale serve ad ancorare la PI3K alla membrana plasmatica mediante interazione dei domini SH-2 con i residui fosfotirosinici dei recettori attivati e stabilizzano l'attività della subunità catalitica p110.

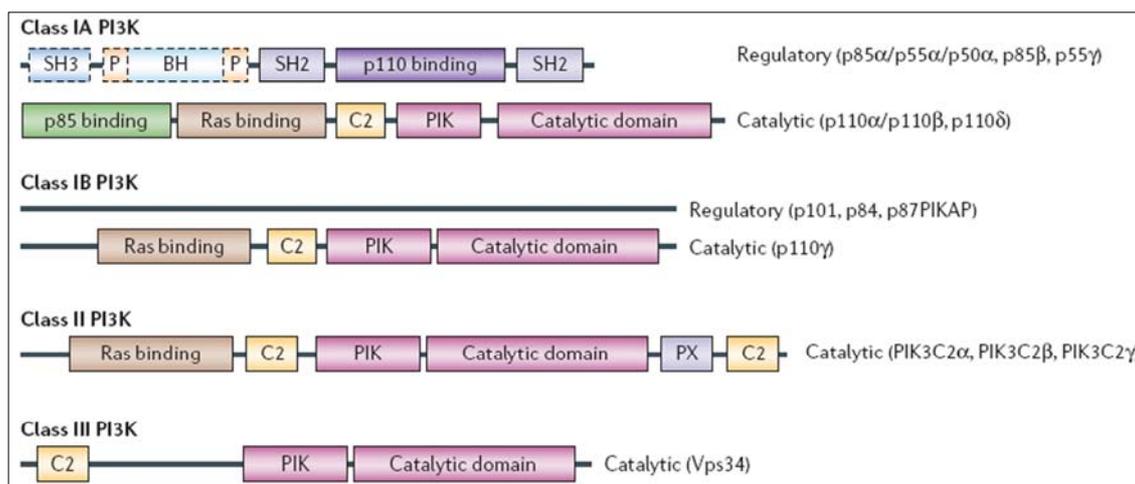


Figura 4. Classificazione della Fosfoinositide 3 chinasi (PI3K). Esse si distinguono in 3 classi, ognuna delle quali mostra una diversa specificità per i substrati. Tutte le isoforme di PI3K sono ampiamente espresse in tutto l'organismo, ad eccezione della classe IA con subunità catalitica p110 δ presente prevalentemente nei linfociti.

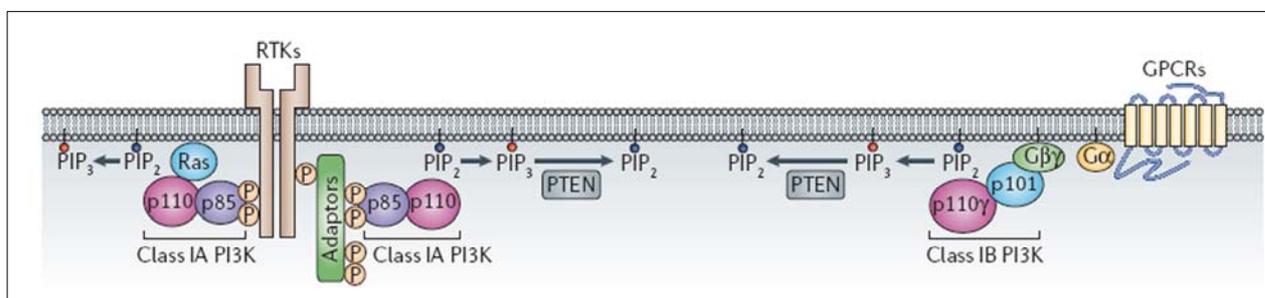


Figura 5. Meccanismo di attivazione della PI3K di classe I. L'attivazione della classe IA avviene mediante recettori per fattori di crescita tirosina-chinasi, mentre l'attivazione della classe IB avviene attraverso i recettori accoppiati a proteine G. PTEN defosforila il fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3) inibendo la segnalazione di PI3K. La fosfatasi SHIP converte il PIP3 in fosfatidilinositolo-3,4-bisfosfato (PIP2).

2.1. ISOFORME DI Akt

Akt è una serina-treonina chinasi nota anche come PKB, ed è l'omologo dell'oncogene virale v-AKT che causa il linfoma a cellule T nel topo.

Esistono 3 isoforme di Akt: Akt1, che è espresso in modo ubiquitario ad alti livelli, con l'eccezione di rene, fegato e milza; Akt2, che ha un'espressione variabile nei diversi organi, con prevalenza a livello dei muscoli scheletrici, organi intestinali e tessuti riproduttivi; Akt3, che è altamente espresso nel cervello e nel testicolo (Figura 6).

Akt contiene un dominio PH (*pleckstrin homology*) capace di interagire con i prodotti lipidici fosforilati di PI3K (principalmente il PIP₃), sintetizzati a livello della membrana. Il reclutamento di Akt a livello della membrana plasmatica porta ad un cambiamento conformazionale che permette al loop di attivazione della chinasi di essere fosforilato sul residuo Thr308 da una protein-chinasi fosfoinositide dipendente (PDK1) e sulla Ser473 posta nel motivo idrofobico C-terminale da un'altra chinasi (PDK2).

Occorre ricordare che l'attività di Akt è modulata da una complessa rete di proteine regolatrici che interagiscono con il dominio PH, chinasi o C-terminale; una di queste è la *heat shock protein 90* (*hsp90*), una proteina *chaperon* che forma un complesso con il *co-chaperon cdc37* ed interagisce con il dominio chinasi di Akt. Piccole molecole in grado di bloccare tale interazione potrebbero quindi rappresentare ottimi farmaci per bloccare tale via. L'asse PI3K/Akt può essere attivato anche in risposta ad alcune forme di stress cellulare, come ad esempio lo shock termico, l'abbassamento del pH, la luce UV, l'ischemia e l'ipossia, rappresentando un meccanismo protettivo che le cellule mettono in atto per sfuggire alla morte cellulare. Quindi, come mostrato in Figura 10, Akt si trova al centro di una complessa rete di processi cellulari che influenzano la proliferazione e il differenziamento cellulare, nonché la progressione lungo il ciclo cellulare e l'apoptosi.

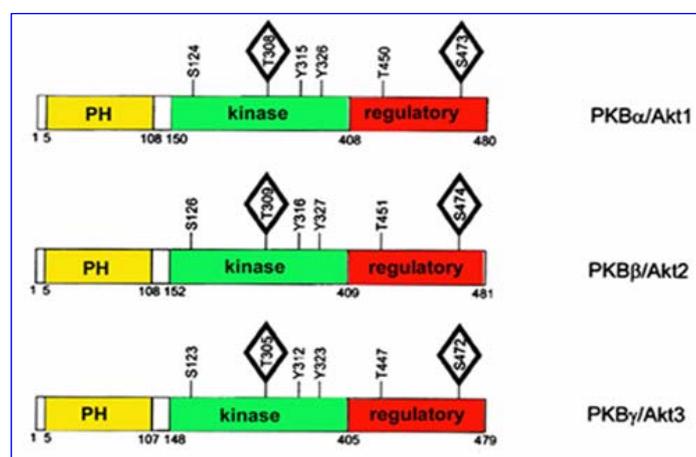


Figura 6. Isoforme di Akt o Proteina chinasi B (PKB).

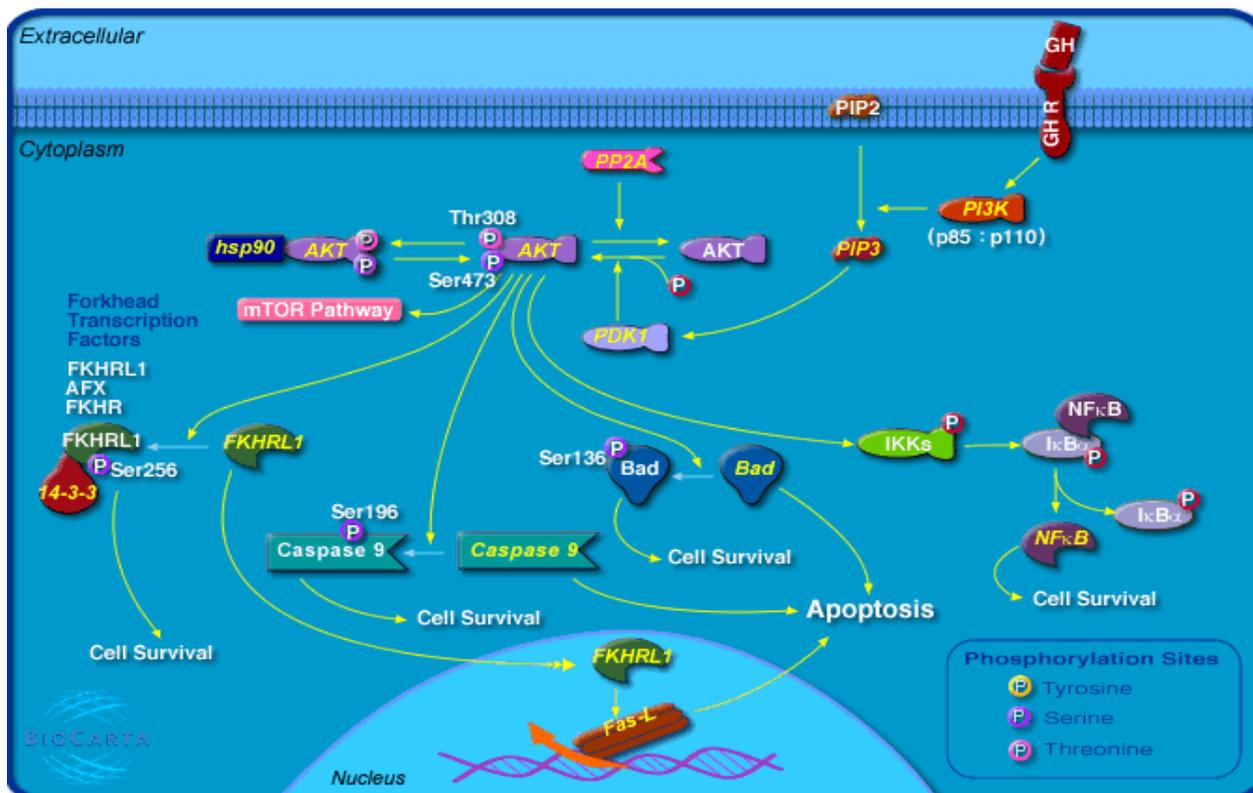


Figura 7. La via di segnalazione cellulare PI3K/Akt è coinvolta in numerosi processi fisiologici della cellula.

2.2. RUOLO DI Akt NEI DISORDINI EMATOPOIETICI

Dal 50 al 70% dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta mostrano fosforilazione sia a livello del residuo Thr308 che di Ser473 in Akt. Finora, non è noto se ci sia correlazione tra livelli di Akt fosforilato e sottotipo di leucemia mieloide acuta, anomalie citogenetiche o percentuale di blasti infiltranti il tumore. Tuttavia, il tempo di sopravvivenza per i pazienti che mostrano attivazione di Akt è significativamente inferiore rispetto al tempo di sopravvivenza nei pazienti che non mostrano alcuna attivazione in Akt.

In circa il 15-20% dei pazienti affetti da AML, si è visto che N-RAS o K-RAS presentano mutazioni puntiformi, che abrogano l'attività GTPasica intrinseca di RAS con conseguente effetto stimolatorio sull'asse PI3K/Akt. Inoltre, nel 20-30% dei pazienti sono state rilevate mutazioni nella porzione extracellulare o intracellulare di *c-kit*, un altro recettore dotato di attività tirosin-chinasica che ha come ligando specifico lo *stem cell factor (scf)*; tali mutazioni attivanti di *c-kit* portano ad una up-regolazione dell'asse PI3K/Akt. Infine, circa il 75% dei pazienti affetti da AML mostra fosforilazione a carico di PTEN, che è significativamente associata alla fosforilazione di Akt e a

ridotta sopravvivenza. E' noto che la fosforilazione di PTEN a livello del dominio regolatore C-terminale stabilizza la fosfatasi, ma la rende meno attiva verso il suo specifico substrato: PIP₃.

Recentemente è stato proposto un altro meccanismo di attivazione della cascata PI3K/Akt nelle cellule leucemiche. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEFG) è una potente molecola proangiogenica, che viene secreta da blasti AML, i quali esprimono recettori per tale molecola (VEGFR-1 e VEGFR-2). E' quindi possibile che in alcuni casi l'up-regolazione di PI3K/Akt sia causata da una produzione autocrina o paracrina di fattori angiogenici.

Inoltre, studi recenti hanno mostrato che l'attivazione dell'asse PI3K/Akt potrebbe essere dovuto anche a mutazioni a carico di Flt-3, un recettore tirosino-chinasico della classe III che è espresso principalmente nelle cellule del sistema emopoietico e gioca un ruolo importante in tutto il processo differenziativo di tali cellule. Flt-3, infatti, attiva Akt mediante le vie di segnalazione dipendenti da Akt o da Ras. Quindi, mutazioni a carico di tale recettore, osservate in alcuni tipi di neoplasie ematologiche tra cui leucemie mieloidi acute, leucemie linfoblastiche acute e mielodisplasie, potrebbero attivare le vie di sopravvivenza cellulare, alterare l'equilibrio tra proliferazione ed apoptosi cellulare e quindi indurre una prognosi più negativa per i pazienti che presentano tali mutazioni (Markovic et al., 2005).

2.3. RUOLO DI Akt NEI MECCANISMI APOPTOTICI

Akt può inibire l'apoptosi utilizzando diversi meccanismi. Infatti, è in grado di promuovere la sopravvivenza fosforilando direttamente regolatori chiave della cascata apoptotica, come ad esempio BAD, un membro della famiglia Bcl-2, che promuove l'apoptosi legando e antagonizzando l'azione dei componenti antiapoptotici della sua stessa famiglia (Bcl-2 e Bcl-xL). Akt può fosforilare BAD a livello della Ser136 e tale modificazione promuove il sequestro di BAD nel citosol, impedendo così l'interazione con Bcl-2 o Bcl-x a livello della membrana mitocondriale, per cui non c'è attivazione dei meccanismi apoptotici.

Un altro bersaglio di Akt sono le SAPKs (*stress-activated protein kinases*), come ad esempio JNK, le quali sono coinvolte nell'induzione dell'apoptosi in seguito all'esposizione a stimoli, ad esempio radiazioni ionizzanti, shock termico o stress osmotico. In questo caso Akt sembra fosforilare e inattivare ASK-1, una chinasi che trasduce segnali a JNK, bloccando così questa via apoptotica.

Akt, inoltre, promuove la fosforilazione e la traslocazione nucleare di mdm-2, che è in grado di mediare l'ubiquitinazione e la degradazione proteosoma-dipendente dell'oncosoppressore p53 e quindi regola negativamente la p53 e antagonizza il *checkpoint* del ciclo cellulare mediato da questo oncosoppressore.

Akt promuove infine la sopravvivenza cellulare mediante fosforilazione di fattori di trascrizione che controllano l'espressione di geni pro- e anti-apoptotici. Tra le molecole bersaglio fosforilate implicate nell'arresto dell'apoptosi c'è la famiglia dei fattori di trascrizione FOXO, la cui fosforilazione da parte di Akt ne altera la localizzazione intracellulare. Quando Akt è inattivo, le proteine FOXO sono localizzate prevalentemente nel nucleo, dove promuovono la trascrizione di geni target proapoptotici come il ligando di FAS. L'attivazione dell'asse PI3K/Akt porta all'esportazione nucleare di tali fattori di trascrizione che, una volta nel citosol, sono degradati attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma e permettono l'attivazione dei processi proliferativi. Akt è anche capace di attivare il fattore kappa B nucleare (NF-kB), un fattore di trascrizione che è coinvolto nella regolazione dei meccanismi di proliferazione, apoptosi e sopravvivenza cellulare. La funzione di NF-kB è regolata attraverso la sua associazione con un co-fattore capace di sequestrarlo e inibirlo: I-kB. La fosforilazione di I-kB da parte di chinasi note come IKKs promuove la degradazione di I-kB attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma e di conseguenza la traslocazione nucleare di NF-kB e l'espressione dei geni *target*.

Un fondamentale regolatore negativo nell'asse della PI3K è la fosfatasi lipidica PTEN che rimuove il fosfato da PIP₃ dando PIP₂. La perdita delle funzioni di PTEN determina un accumulo di PIP₃ e un aumento del segnale dell'asse di sopravvivenza PI3K/Akt. La perdita della regolazione di PTEN è frequente nelle trasformazioni neoplastiche e PTEN risulta essere spesso mutato o deletato in varie neoplasie. E' per questo motivo che viene considerato come un gene oncosoppressore.

2.4. RUOLO DI Akt NELLA PROGRESSIONE ATTRAVERSO IL CICLO CELLULARE

Studi recenti mostrano come l'asse PI3K/Akt sia coinvolto nella progressione delle cellule attraverso il ciclo cellulare. Tuttavia, sebbene siano state proposte diverse ipotesi, non sono ancora stati del tutto chiariti i meccanismi molecolari di attivazione della proliferazione dei blasti leucemici mediati dall'asse PI3K/Akt.

Nelle cellule HL60 (Leucemia Promielocitica Acuta) è stata dimostrata una stretta correlazione tra la localizzazione citoplasmatica di p27^{Kip1}, un inibitore diretto di cdk2, e l'attivazione di Akt (Cappellini et al., 2003). Infatti, Akt può fosforilare p27^{Kip1}, che a sua volta attiva alcuni fattori di trascrizione, tra cui E2F-1, con un effetto diretto sulla replicazione del DNA e la proliferazione cellulare. Infatti, l'attivazione di p27^{Kip1} induce la traslocazione della proteina stessa al citoplasma, dove non può più esercitare il proprio effetto inibitorio e quindi c'è aumento della proliferazione cellulare (Martelli et al., 2006).

Inoltre, si è visto che nelle cellule HL60 anche i livelli della Ciclina D1 aumentano. Questo potrebbe essere dovuto all'inibizione di un enzima (GSK3 β), che normalmente fosforila ed attiva la ciclina D1 nella progressione lungo il ciclo cellulare. Infatti, GSK3 è un enzima importante nel regolare la sintesi del glicogeno in tessuti responsivi all'insulina; l'insulina ne permette la fosforilazione per mezzo di Akt a livello del residuo S9 e questo meccanismo porta all'inattivazione dell'enzima. E' ormai noto che GSK3 gioca molteplici ruoli in importanti processi cellulari inclusi il differenziamento, la proliferazione e la trasformazione neoplastica. Sebbene i meccanismi attraverso i quali GSK3 partecipa alla trasformazione neoplastica non siano stati completamente chiariti, sembra che vi sia il coinvolgimento della ciclina D1 (Huang et al., 2006).

L'aumento della proliferazione potrebbe però essere anche conseguenza dell'esclusione dal nucleo dei fattori di trascrizione della famiglia FOXO. Tali fattori, una volta nel nucleo, inducono l'espressione di tre geni *target* che portano all'arresto nella fase G1/S: p27^{Kip1}, p21Waf/Cip1 e la proteina p130 Rb. I fattori FOXO possono anche promuovere l'arresto del ciclo cellulare attraverso la repressione della ciclina D1 e della ciclina D2, due regolatori positivi del ciclo cellulare.

3. TARGET MOLECOLARI A VALLE DI Akt: mTOR, 4E-BP1 e p70S6K

Uno dei bersagli a valle di Akt è mTOR (mammalian Target of Rapamycin), una Serina-/Treonina protein chinasi altamente conservata che ha un ruolo essenziale nella regolazione della crescita e proliferazione cellulare, controllando tali processi a livello traduzionale (Tee and Blenis, 2005) e influenzando i meccanismi di progressione del ciclo cellulare. Infatti, mTOR è in grado di regolare la sintesi di proteine-chiave, come ad esempio pRb, p27^{Kip}, ciclina D1, c-myc o STAT-3. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato il coinvolgimento di mTOR nel processo di morte cellulare, per cui un'alterata regolazione di questa chinasi potrebbe portare all'attivazione di meccanismi anti-apoptotici (Vega et al., 2006; Xu et al., 2005).

Come mostrato in Figura 8, anche la regolazione di mTOR mediante Akt è un processo complesso. Akt inibisce la funzione di TSC2 (*Tuberous Sclerosis 2 o Hamartin*) attraverso un meccanismo di fosforilazione diretta. TSC2 è una proteina GAP (GTP-ase Activating Protein) che agisce in associazione con la proteina TSC1 putativa (*Tuberin*) per inattivare le proteine G Rheb (*Ras Homolog Enriched in Brain*). La fosforilazione di TSC2 da parte di Akt reprime l'attività GAP del complesso TSC1/TSC2, permettendo l'accumulo di Rheb in uno stato legato a GTP. Il complesso Rheb-GTP può poi attivare, attraverso un meccanismo non ancora del tutto chiarito, l'attività chinasi di mTOR, che forma un complesso con Raptor (*Regulatory Associated Protein of mTOR*) e mLST8 (denominato anche G β L), una proteina omologa alla subunità β delle proteine G

eterotrimeriche. Il complesso mTOR/Raptor/mLST8 (denominato anche mTORC1) è sensibile alla rapamicina e in alcuni casi inibisce Akt attraverso un feedback negativo che coinvolge, almeno in parte, p70S6K. Il rapporto che lega Akt e mTOR è ulteriormente complicato dall'esistenza di un complesso mTOR/Rictor (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*)/mLST8 (denominato anche mTORC2), che presenta un'attività non sensibile alla rapamicina.

A valle di mTOR si trovano due substrati ben caratterizzati: 4E-BP1 (*4E-Binding Protein 1*) e la p70S6K (*p70 Ribosomal S6 Kinase*). Da un lato, la fosforilazione di 4E-BP1 da parte di mTOR inibisce la capacità di legare il fattore di iniziazione trascrizionale 4E (eIF-4E), una proteina che viene reclutata dal complesso di inizio della trascrizione per regolare la sintesi proteica e indurre la trascrizione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare. D'altro canto, mTOR media anche la fosforilazione e la conseguente attivazione di p70S6K, che a sua volta fosforila la proteina ribosomiale S6 in modo che possa partecipare alla sintesi proteica dando inizio al cosiddetto complesso di iniziazione traduzionale.

mTOR agisce dunque da *checkpoint* per la progressione nel ciclo cellulare, in quanto regola numerosi step della sintesi proteica e favorisce la produzione di molecole-chiave come c-myc, ciclina D1 e proteine ribosomiali.

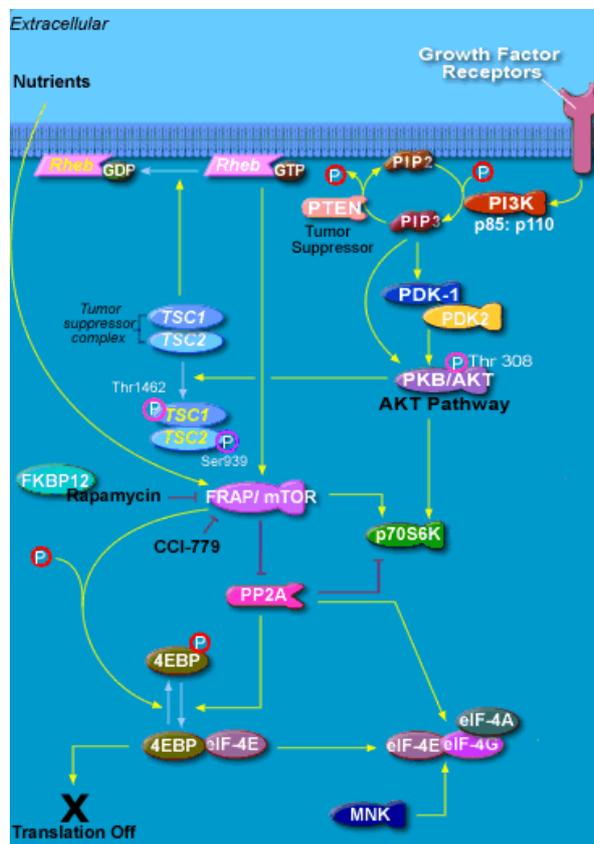


Figura 8. Asse di attivazione Akt/mTOR e bersagli molecolari a valle (4E-BP1 e p70S6K).

4. SIGNALLING INOSITIDE-DIPENDENTE: FOSFOLIPASI C β 1 (PI-PLC β 1)

Il metabolismo lipidico ha assunto sempre più importanza, soprattutto da quando è stata dimostrata l'esistenza di un ciclo nucleare dei fosfoinositidi (Martelli et al., 1992). In particolare, la presenza nel nucleo sia dei fosfoinositidi sia degli enzimi responsabili del loro metabolismo ha suggerito la presenza di meccanismi di regolazione propri e indipendenti (Irvine, 2003; Martelli et al., 2004). Infatti, il ciclo nucleare dei fosfoinositidi non è semplicemente una duplicazione di ciò che avviene sulla membrana plasmatica, ma risponde a stimoli differenti e può modulare diversi processi cellulari.

La fosfolipasi C β 1 (PI-PLC β 1) è l'isoforma maggiormente associata al ciclo nucleare dei fosfoinositidi ed è un enzima-chiave nella trasduzione del segnale lipidico. La PI-PLC β 1 catalizza l'idrolisi del fosfatidil-inositolo 4,5-bisfosfato (PIP₂), inducendo la formazione di diacilglicerolo (DAG) e di inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP₃), che a loro volta agiscono da secondi messaggeri attivando bersagli specifici, coinvolti nei processi di segnalazione che regolano il differenziamento e la proliferazione cellulare (Cocco et al., 2001). In particolare, è stato osservato che la PI-PLC β 1 nucleare induce la traslocazione della proteina chinasi C (PKC) nel nucleo, dove fosforila alcuni bersagli nucleari, tra cui i fattori di trascrizione. Di conseguenza, l'alterazione della regolazione del ciclo lipidico della PI-PLC β 1 nucleare può avere effetti importanti sulla cancerogenesi e sulla progressione tumorale. Per questo motivo, si è cercato di analizzare il ruolo della PI-PLC β 1 in diversi sistemi tumorali.

Innanzitutto, è stato dimostrato che la PI-PLC β 1 nucleare è un intermediario centrale nella mediazione dell'effetto mitogeno del fattore IGF-1 nelle cellule Swiss 3T3, attraverso un meccanismo di fosforilazione p44/42 MAPK-dipendente, che induce l'attivazione dell'enzima (Manzoli et al., 1997). Inoltre, si è visto che la PI-PLC β 1 nucleare regola l'attivazione della progressione del ciclo cellulare a livello del *checkpoint* nella fase G1. In particolare, nelle cellule di eritroleucemia murina di Friend, è stato osservato che la sovra-espressione dell'enzima è correlata all'attivazione del sistema ciclina D3/cdk4 (Figura 9) che fosforila la proteina pRb, la quale a sua volta attiva il fattore di trascrizione E2F-1 (Faenza et al., 2000). Questo fenomeno porta quindi ad una regolazione negativa del differenziamento delle cellule di Friend, per cui la proliferazione cellulare è costantemente attivata (Matteucci et al., 1998). Tuttavia, la regolazione del differenziamento cellulare non mantiene un comportamento simile in tutti i sistemi biologici; ad esempio nel sistema di cellule di mioblasti murini C2C12, si è visto che l'espressione della PI-PLC β 1 aumenta durante il differenziamento miogenico (Faenza et al., 2003), esattamente il contrario di ciò che era stato osservato durante il differenziamento eritroide delle cellule di Friend (Martelli et al., 1994). Infine, mediante l'uso delle tecniche di *microarray*, è stata analizzata di

recente l'espressione dei geni in cellule di eritroleucemia murina di Friend in cui era stata indotta la sovra-espressione della PI-PLC β 1 (Fiume et al., 2005). In particolare, in questo sistema, è stato evidenziato che uno dei bersagli molecolari della PI-PLC β 1 è la molecola CD24, di cui già si riconosce un ruolo non solo nella biologia dei tumori (Kristiansen et al., 2004), ma anche a livello dei meccanismi di proliferazione e differenziamento delle cellule emopoietiche (Fiume et al., 2005; Wenger et al., 1993).

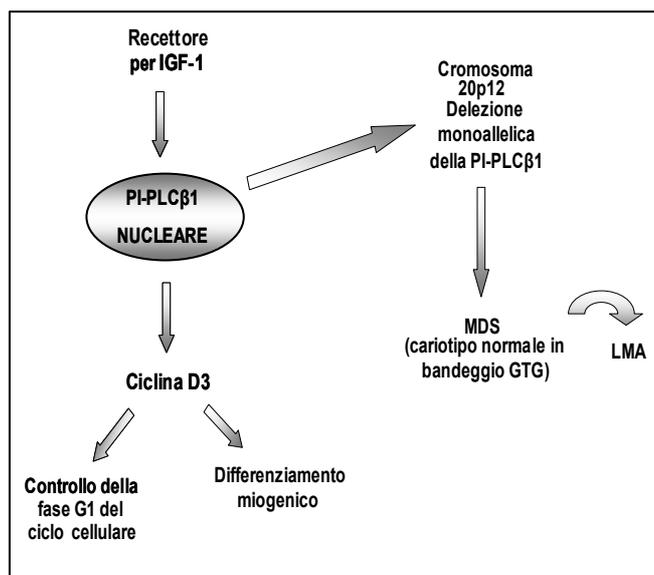


Figura 9. La PI-PLC β 1 nucleare regola il differenziamento miogenico e la normale crescita cellulare agendo in entrambi i casi sulla ciclina D3 e regolando la progressione del ciclo cellulare in fase G1. La delezione mono-allelica del suo gene potrebbe risultare responsabile della progressione delle MDS in AML, essendo coinvolto nello sbilanciamento del ciclo cellulare.

4.1. STRUTTURA DEL GENE DELLA PI-PLC β 1

Negli ultimi anni, diversi studi si sono concentrati sulla caratterizzazione molecolare del gene per la PI-PLC β 1 (Peruzzi et al., 2002; Peruzzi et al., 2000). Mediante la tecnica di Ibridazione Fluorescente in situ (FISH), il gene che codifica per la PI-PLC β 1 è stato mappato sul braccio corto del cromosoma 20, nel locus 20p12.3, in un intervallo di 1.9 cM delimitato dai marcatori D20S917 a 25 cM e D20S177 a 26.9 cM (Peruzzi et al., 2000). Il gene dista meno di 1Mb dal gene che codifica per la PI-PLC β 4 (locus 20p12.3), un'altra fosfolipasi umana la cui regolazione è totalmente indipendente da quella della PI-PLC β 1. Il gene della PI-PLC β 1 copre una regione sul genoma di 250 kbp ed è formato da 36 piccoli esoni e 35 introni molto grandi (Peruzzi et al., 2000). Dallo stesso gene si producono due isoismi, denominati *a* e *b*, che si formano per la presenza di un sito di *splicing* alternativo presente nella regione 5'-UTR oppure nella regione 3'-UTR (Peruzzi et al.,

2002). Come mostrato in Figura 10, se il sito di *splicing* si trova nella regione 5'-UTR, nell'isozima *b* è presente un esone aggiuntivo contenente un codone di stop che induce la formazione di una proteina troncata che ha un peso molecolare di circa 140 kDa, mentre l'isozima *a* dà origine ad una proteina di circa 150 kDa. Invece, se il sito di *splicing* alternativo è presente nella regione 3'-UTR, si ha la formazione di una diversa regione 3'-UTR che dà origine ad un altro isozima *b*, che produce anch'esso una proteina più corta. Oltre al peso molecolare, le due proteine differiscono anche per la diversa localizzazione cellulare, in quanto la PI-PLC β 1b si trova prevalentemente nel nucleo, mentre la PI-PLC β 1a è uniformemente distribuita tra nucleo e citoplasma (Bahk et al., 1998).

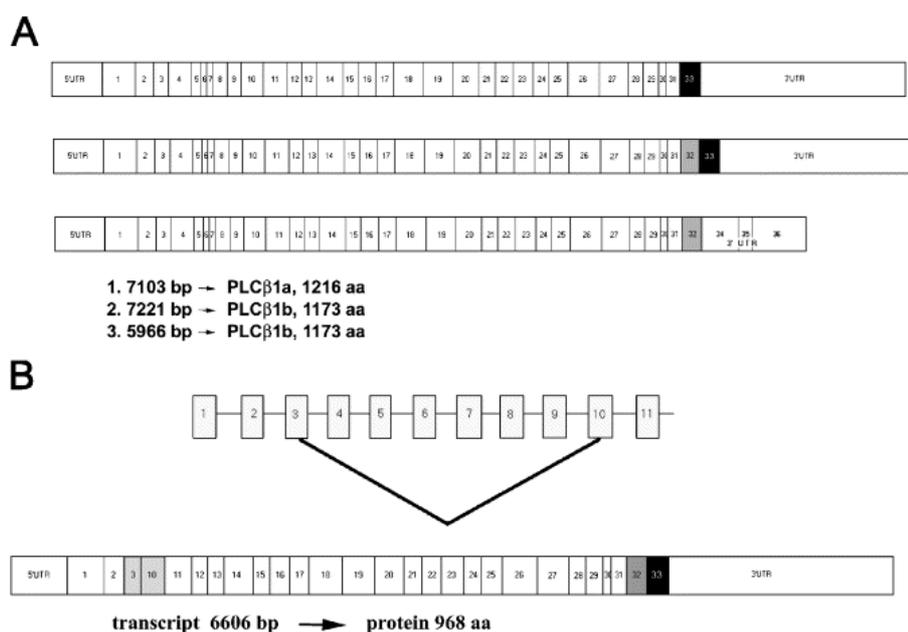


Figura 10. (A) Struttura del cDNA della PI-PLC β 1a e della PI-PLC β 1b. In alto è rappresentato il cDNA della PI-PLC β 1a, in mezzo il cDNA della PI-PLC β 1b ed in basso il cDNA della PI-PLC β 1b derivante dallo *splicing* alternativo che coinvolge un diverso 3'UTR. (B) Struttura della variante che manca degli esoni 4-9.

4.2. STRUTTURA PROTEICA DELLA PI-PLC β 1

La PI-PLC β 1 si trova nella cellula sotto forma di due isoizimi (PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b) che agiscono come effettori a valle di recettori di membrana associati a proteine G (GPCR). Le sequenze proteiche di entrambi gli isoizimi presentano alcune strutture fondamentali. E' costituita infatti da due domini altamente conservati (X e Y), che formano il sito catalitico dell'enzima, intorno ai quali si organizzano altre regioni funzionali, rappresentati da domini PH, domini a mano EF e un singolo dominio a motivo C2 (Figura 11). Inoltre, sono presenti alcune sequenze funzionalmente molto importanti, rappresentate dal segnale di localizzazione nucleare (NLS), di attivazione dell'enzima a livello nucleare e di terminazione dell'attivazione (Rhee SG, 2001). Come

evidenziato in precedenza, le due proteine differiscono per la localizzazione cellulare, in quanto la PI-PLC β 1b si trova prevalentemente nel nucleo, mentre la PI-PLC β 1a è uniformemente distribuita tra nucleo e citoplasma. Inoltre, è importante sottolineare il fatto che in questi due compartimenti cellulari i meccanismi di attivazione della PI-PLC β 1 risultano essere totalmente indipendenti. A livello citoplasmatico la PI-PLC β 1 viene attivata grazie all'interazione con la subunità $G\alpha_q$ attivata delle proteine G (Lee et al., 1992). Infatti, tale subunità interagisce con il dominio C2 e i residui della regione C-terminale (Park et al., 1993) della PI-PLC β 1 ancorata a livello della membrana plasmatica in seguito all'interazione del suo dominio PH con il fosfatidil-inositolo-3,4,5 trisfosfato (PIP $_3$) (Razzini et al., 2000). A livello nucleare, invece, l'attivazione della PI-PLC β 1 sembra riconducibile alla fosforilazione di una sequenza consenso (P-S-S-P), situata a livello dei residui amminoacidici 980-983, in corrispondenza della regione C-terminale. Tale sequenza viene di solito fosforilata da una chinasi (MAPK) il cui substrato naturale è rappresentato da proteine che inducono la mitosi cellulare. Infatti, in fibroblasti di topo Swiss 3T3 trattati con IGF-1, che provoca la traslocazione nucleare della p42/44 MAPK attivata, si osserva un'iper-fosforilazione del residuo Ser982 della PI-PLC β 1 nucleare (Martelli et al., 2000). La sostituzione di questo residuo con un residuo di Gly blocca l'attivazione della fosfolipasi, fornendo così una possibile prova a favore di questo meccanismo d'attivazione (Xu et al., 2001).

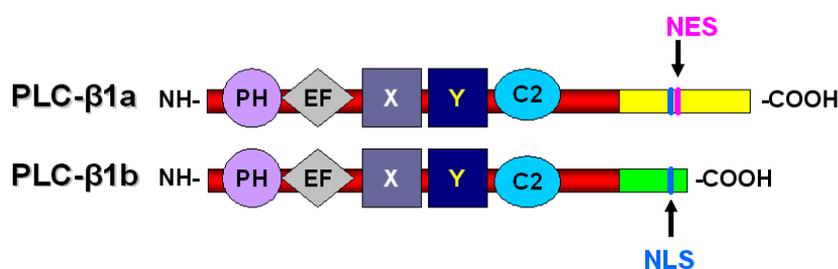


Figura 11. Domini funzionali delle proteine codificate dal gene della PI-PLC β 1.

4.3. RUOLO DELLA PI-PLC β 1 NEI DISORDINI EMATOPOIETICI

Recenti ricerche hanno messo in evidenza una correlazione statisticamente significativa tra la presenza della delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1 e l'*outcome* clinico in pazienti affetti da MDS (Follo, 2008). Attraverso la metodica FISH, è stato infatti dimostrato che tra i pazienti affetti da MDS quelli che hanno la delezione criptica mono-allelica del gene della PI-PLC β 1 hanno un *outcome* clinico peggiore, con una maggiore probabilità di evolvere in AML, rispetto a pazienti che invece hanno entrambi gli alleli. Inoltre, si è visto che la presenza della delezione correla con un'espressione differente delle due varianti di *splicing* della PI-PLC β 1 nei pazienti MDS ad alto rischio rispetto ai donatori sani e questo potrebbe riflettersi in uno sbilanciamento nella proliferazione e nell'apoptosi. La delezione è infatti responsabile di una robusta riduzione della PI-PLC β 1b, localizzata prevalentemente nel nucleo e coinvolta nella progressione fisiologica dalla fase G1 del ciclo cellulare, il che potrebbe suggerire un ulteriore meccanismo alterato nel ciclo cellulare dei pazienti affetti da MDS (Follo, 2008). Infatti, dai dati ottenuti sembra che solo la PI-PLC β 1b sia coinvolta nella progressione da MDS a AML, e questo potrebbe riflettersi in uno sbilanciamento dei meccanismi legati a proliferazione differenziamento cellulare, essendo l'isoforma 1b quella prevalentemente nucleare e coinvolta nell'attivazione del complesso ciclina D3/cdk4, così come nella regolazione della molecola CD24 (Faenza et al., 2000; Fiume et al., 2005).

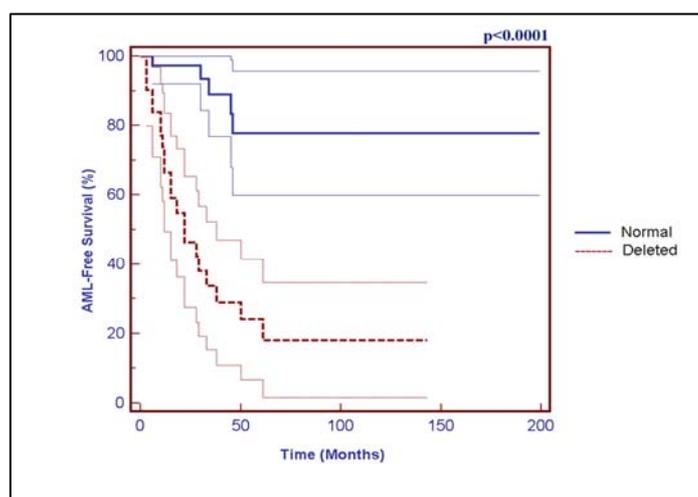


Figura 12. Correlazione statistica tra la presenza della delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1 e *outcome* clinico.

SCOPO DELLA RICERCA

Come già illustrato in precedenza, le MDS sono un gruppo eterogeneo di malattie del sangue che coinvolgono alterazioni a livello delle cellule staminali emopoietiche, che non sono più in grado di maturare e differenziare in modo adeguato. I meccanismi patogenetici che sottostanno a questa patologia non sono stati però del tutto chiariti, anche se farmaci demetilanti, quali la Azacitidina sembrano essere efficaci.

Recentemente è stato dimostrato che pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano attivazione dell'asse PI3K/Akt, indicando quindi uno sbilanciamento dei meccanismi apoptotici (Follo et al., 2007). Poiché Akt può essere coinvolta in vie importanti per la proliferazione cellulare, è stato valutato il suo ruolo nell'attivazione dell'asse mTOR/4E-BP1/p70S6K. In particolare, l'approccio sperimentale usato in questa parte dello studio ha implicato l'uso di metodiche di immunocitochimica e citofluorimetria, per l'analisi dell'espressione proteica e del ciclo cellulare, oltre a studi sulla capacità clonogenica utili per valutare il differenziamento delle cellule staminali dei pazienti esaminati. Lo studio è stato condotto in condizioni basali e dopo trattamento con rapamicina, uno specifico inibitore di mTOR, che è servito per comprendere il ruolo di quest'asse di segnalazione nelle MDS.

Inoltre è stato evidenziato che alcuni pazienti affetti da MDS ad alto rischio e portatori di una delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1 mostrano un'evoluzione clinica peggiore rispetto ai pazienti con entrambi gli alleli con elevata probabilità di evolvere in AML (Follo, 2008). Altri studi hanno dimostrato che l'espressione della PI-PLC β 1 è down-regolata durante il differenziamento delle cellule di eritroleucemia murina di Friend (Martelli et al., 1994), rafforzando l'ipotesi che questo enzima possa giocare un ruolo importante nella generazione dei blasti dei pazienti affetti da MDS (Cocco et al., 2005). Inoltre, Muovendo da queste premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare il ruolo delle vie di segnalazione inositide-dipendente in pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio di evoluzione in AML come bersaglio terapeutico in seguito a trattamenti farmacologici. L'analisi è stata condotta a diversi livelli.

Innanzitutto, sono state effettuate analisi per valutare la presenza e lo stato della metilazione di isole CpG nella regione del promotore della PI-PLC β 1 e dell'espressione genica dell'isoforma b della PI-PLC β 1 prima e durante il trattamento terapeutico con Azacitidina.

E' stato inoltre verificato se l'effetto dell'Azacitidina fosse diretto a livello delle isole CpG del promotore della PI-PLC β 1, clonando il promotore in un vettore contenente la fosfatasi alcalina come gene reporter. Sono state successivamente correlate le variazioni della metilazione e della trascrizione genica in pazienti affetti da MDS, durante il trattamento con Azacitidina, rispetto alla presenza o all'assenza della delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1.

Inoltre è stata valutata l'espressione di proteine-chiave nel signalling lipidico intranucleare fosfoinositide-dipendente. Da un lato è stata valutata l'espressione della PI-PLC β 1, di p-Akt e PIP₂, in condizioni basali e durante il trattamento terapeutico.

Complessivamente si è quindi cercato di studiare quale fosse l'effetto di terapie farmacologiche innovative sulle vie di trasduzione del segnale inositide-dipendente in modo da individuare nuovi bersagli terapeutici nelle sindromi mielodisplastiche.

MATERIALI e METODI

1. Colture cellulari *in vitro*

Cellule umane di leucemia linfoblastica acuta T (CEM), cellule umane di leucemia promielocitica acuta (HL60), cellule umane di leucemia acuta T (Jurkat), cellule umane di adenocarcinoma della cervice (HeLa) e cellule umane di carcinoma mammario (MDA-MB-453) sono state incubate a 37°C con 5% CO₂ in terreno RPMI 1640 (Cambrex BioScience), con l'aggiunta di 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato e streptomicina/penicillina, ad una densità cellulare ottimale di 0.3x10⁶ - 0.8x10⁶ cellule/mL.

2. Caratteristiche dei Pazienti

I campioni di sangue periferico (PB) e midollare (BM) sono stati prelevati da donatori sani e pazienti affetti da MDS. Tutti i soggetti inseriti in questo studio provenivano dall'Istituto di Ematologia ed Oncologia Medica "L. e A. Seràgnoli" dell'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna ed avevano dato il loro consenso informato, come richiesto dalle linee guida internazionali. I pazienti sono stati diagnosticati secondo la classificazione FAB, mentre il fattore IPSS è stato utilizzato per suddividere i pazienti in alto e basso rischio di evoluzione in AML; in particolare i pazienti con IPSS Low o Intermediate-1 sono stati considerati a basso rischio, mentre i soggetti con IPSS Intermediate-2 o High sono stati ritenuti ad alto rischio di evoluzione in AML.

I pazienti sono stati inseriti in un protocollo che prevedeva un braccio di controllo (con sola terapia di supporto) ed uno con somministrazione di Azacitidina (75 mg/m²/die per 7 giorni in cicli di 28 giorni) e valutazione delle condizioni ematologiche una volta al mese.

3. Separazione delle cellule mononucleate

Le cellule mononucleate sono state separate con la metodica Ficoll (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. In breve, i campioni di sangue midollare e periferico sono stati diluiti 1:3 con soluzione fisiologica sterile (0,9% p/v NaCl). Sotto cappa a flusso laminare è stato disposto un numero di provette sterili da 15 mL adeguato alla quantità di materiale da processare. In particolare, è stata considerata una provetta ogni 5 mL di sangue diluito. In ciascuna provetta da 15 mL sono stati dispensati 3 mL di Ficoll. Successivamente, 5 mL di campione diluito sono stati introdotti nella provetta contenente il Ficoll, evitando che il campione si mescolasse al Ficoll stesso. Il campione è poi stato centrifugato a 1900 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente e senza freno. Al termine della centrifuga, all'interno

della provetta, procedendo dal basso verso l'alto, si distinguono diverse fasi: globuli rossi e granulociti, Ficoll, cellule mononucleate disposte ad anello e plasma (Figura 13).

Con una pipetta *pasteur* sterile è stato prelevato l'anello delle cellule mononucleate, aspirando con un movimento circolare lungo l'anello e trasferendo il contenuto in una nuova provetta da 15 mL.

Il campione è stato poi diluito con soluzione fisiologica sterile (Fresenius Kabi, Italia) fino al raggiungimento di un volume totale di 10 mL ed è poi stato centrifugato a 1800 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e senza freno. È stato poi fatto un secondo lavaggio con le stesse modalità sopra descritte, ma questa volta centrifugando a 1600 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e senza freno. Per eliminare gli eventuali globuli rossi presenti nel *pellet* è stato quindi aggiunto 1 mL di acqua sterile, che è stata lasciata agire per 1 minuto esatto, prima dell'aggiunta di soluzione fisiologica sterile fino a un volume totale di 10 mL. Il campione è stato poi centrifugato a 1600 rpm per 10 minuti, a temperatura ambiente e senza freno. Le cellule sono infine state risospese in PBS1x sterile e contate.

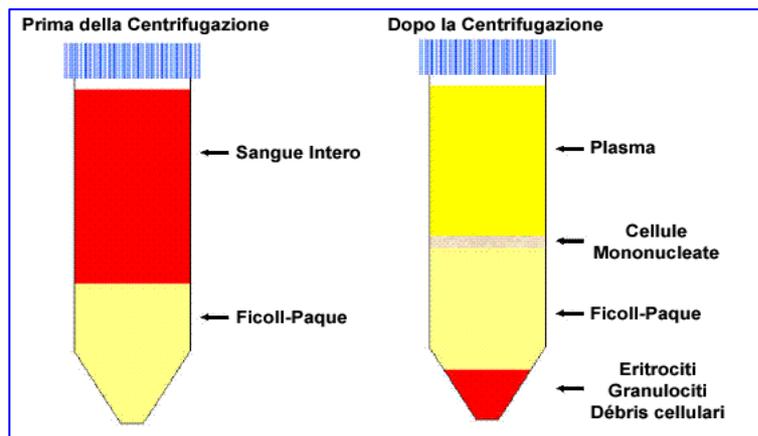


Figura 13. Separazione su gradiente di densità Ficoll-Paque.

4. Analisi Immunocitochimica

Le cellule mononucleate estratte da pazienti affetti da MDS e da donatori sani, così come le linee cellulari HL60 e CEM, sono state sottoposte ad analisi immunocitochimica, seguendo il protocollo descritto da Nyakern et al (Nyakern et al., 2006) . Gli anticorpi utilizzati in questo studio sono mostrati in Tabella 4.

In breve, dopo essere state risospese in terreno RPMI-1640 (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) ad una concentrazione di 0.3×10^6 cell/mL, le cellule sono state poste su vetrini carichi elettrostaticamente utilizzando lo strumento Shandon Cytospin (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA) con un'accelerazione lenta per 5 minuti a 200 rpm/min. I vetrini sono stati fissati con formaldeide al 4% (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) in un tampone PBS (phosphate-buffered saline 1x, pH 7.4) per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS1x da 5 minuti ciascuno, le cellule sono state permeabilizzate con 0.2% Triton X-100 in PBS1x per 10 minuti a temperatura ambiente. In seguito, i vetrini sono stati lavati in PBS1x e sottoposti ad una saturazione di 60 minuti con una miscela contenente il 5% di albumina sierica bovina (BSA) in PBS1x a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state incubate *overnight* a +4°C in una camera umida con i corrispettivi anticorpi primari diluiti in una soluzione all'1% di BSA in PBS1x. Il giorno successivo, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi da 5min ciascuno con una soluzione contenente 0.1% Tween-20 in PBS1x e incubate in una camera umida con i corrispettivi anticorpi secondari coniugati con Cy3 (diluiti 1:5000) o con FITC (diluiti 1:200) al buio per 45 minuti a temperatura ambiente. Per verificare la specificità degli anticorpi utilizzati sono state anche effettuate incubazioni con il solo anticorpo secondario. Come colorante di contrasto per i nuclei è stata utilizzata una soluzione contenente DAPI/Antifade (Resnova, Rome, Italy).

Le immagini sono state acquisite usando un microscopio Zeiss AxioImager Z1, con un obiettivo 60x/NA 1.40, accoppiato ad una fotocamera digitale Zeiss AxioCam (MRm), avente un software Zeiss Axio Vision (v. 4.5) ed un modulo per l'analisi della co-localizzazione. Tutte le immagini sono state ottenute usando lo stesso tempo di esposizione e per ogni vetrino sono state analizzate almeno 50-100 cellule.

Tabella 4. Anticorpi primari e secondari

Anticorpi Primari			
ANTICORPO	CODICE	SPECIE	DILUIZIONE
AKT	Cell Signaling Tech. 9272	Rabbit	1:200
pAkt (Ser473)	Cell Signaling Tech. 4058	Rabbit	1:200
mTOR	Cell Signaling Tech. 2972	Rabbit	1:100
p-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling Tech. 2976	Rabbit	1:100
p70S6K	Cell Signaling Tech. 9202	Rabbit	1:100
p-p70S6K (Thr389)	Cell Signaling Tech. 9206	Mouse	1:100
4EBP1	Cell Signaling Tech. 9644	Rabbit	1:100
p-4EBP1 (Ser65)	Cell Signaling Tech. 9451	Rabbit	1:100
tERK 1/2	Cell Signaling Tech. 9102	Rabbit	1:250
pERK 1/2 (Thr202/Thr204)	Cell Signaling Tech. 4376	Rabbit	1:175
PLC β 1	Santa Cruz Biotech. R233	Rabbit	1:100
PIP2	Echelon Biosc. INC Z-P045	Mouse	1:100
CD33	Miltenyi Biotec 130-045-501	Mouse	1:100
CD71	Miltenyi Biotec 130-046-201	Mouse	1:100
Anticorpi Secondari			
IgG Anti-Rabbit FITC	Sigma-Aldrich	Sheep	1:200
IgG Anti-Mouse FITC	Sigma-Aldrich	Sheep	1:200
IgG Anti-Mouse Cy3	Sigma-Aldrich	Goat	1:5000
IgG Anti-Mouse Cy3	Sigma-Aldrich	Goat	1:5000

5. Separazione delle cellule CD33⁺

Le cellule CD33⁺ sono state ottenute dalle cellule mononucleate totali dopo separazione immunomagnetica usando il kit MiniMACS per le cellule CD33 (Miltenyi Biotec) secondo le istruzioni della ditta produttrice.

In breve, le cellule sono state centrifugate a 800 rpm, ed è poi stato eliminato il surnatante. Il *pellet* è poi stato risospeso in 80 μ L di tampone di eluizione (PBS pH 7.2, 0,5% BSA e 2mM EDTA) e sono stati aggiunti 20 μ L di biglie immunomagnetiche (MACS microbeads Miltenyi Biotec Germany) ogni 10^7 cellule; il tutto è stato mescolato ed incubato 15 minuti a +4 °C. Le cellule sono poi state lavate in 1 mL di PBS1x ogni 10^7 cellule e centrifugate a 800 rpm per 10 minuti; è stato poi eliminato il surnatante e il *pellet* è stato risospeso in 500 μ L di PBS1x. Come mostrato in Figura 14, la colonna di eluizione MS è stata posta nell'appropriato supporto ed il supporto nel campo magnetico. In seguito, sono stati aggiunti 500 μ L di PBS1x per equilibrare la colonna. La

sospensione cellulare è stata posta nella colonna, che ha trattenuto le cellule marcate e ha invece eluito quelle non marcate. La colonna è poi stata lavata 3 volte con il tampone di eluizione e la frazione di cellule non marcate è stata raccolta. La colonna è stata poi rimossa dal separatore magnetico e messa in un tubo pulito. Infine, è stato aggiunto 1 mL di tampone di eluizione e, applicando l'apposito stantuffo fornito dal kit, è stata immediatamente eluita la frazione marcata contenente cellule CD33⁺.

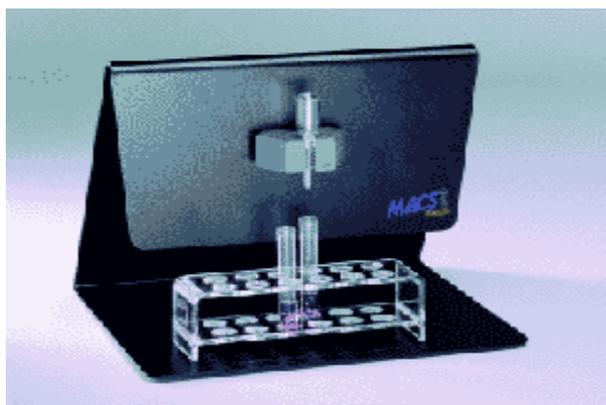


Figura 14. MiniMACS per la separazione delle cellule CD33⁺ e CD34⁺.

6. Analisi Citofluorimetrica per la quantificazione dell'apoptosi

Le cellule CD33⁺ e CD33⁻ sono state coltivate in terreno completo EGM-2 (Cambrex BioSciences) in presenza di rapamicina (#R0395, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) per 48h oppure LY294002 (#L9908, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) per 24h.

Al termine dei tempi di trattamento, le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1000 rpm per 10 minuti. Il *pellet* è stato risospeso in 1 mL di PBS1x freddo ed è stato nuovamente centrifugato a 1000 rpm per 10 minuti. Successivamente, il *pellet* è stato risospeso in 1 mL di etanolo 70% freddo per fissare le cellule ed i campioni sono stati conservati a -20°C per almeno 12 ore. Quindi, i campioni sono stati centrifugati a 1000 rpm per 10 minuti a +4°C, il *pellet* è stato risospeso in 1 mL di PBS1x freddo e nuovamente centrifugato alla stessa velocità. Infine, il *pellet* è stato risospeso in ioduro di propidio in modo tale da raggiungere una concentrazione di 50 µg/mL. Lo ioduro di propidio è un intercalante del DNA che permette di discriminare le cellule morte da quelle vive, in quanto non riesce a superare la membrana plasmatica se questa è integra.

Dopo un'incubazione con ioduro di propidio per almeno 30 minuti al buio, si è proceduti all'analisi del ciclo cellulare per determinare il contenuto di DNA, mediante un citofluorimetro a flusso (Coulter Epics XL/XL-MCL, Beckman Coulter) e l'appropriato software (System II, Beckman Coulter). Almeno 10.000 eventi/campione sono stati acquisiti. I risultati sono poi stati analizzati statisticamente attraverso il software GraphPad Prism (v. 3.0).

7. Analisi Citofluorimetrica per l'analisi del fenotipo

Per misurare i livelli di p-Akt nelle cellule è stato utilizzato il citofluorimetro Coulter Epics XL/XL-MCC. Inoltre sono stati utilizzati due reagenti, uno per la fissazione ed uno per la permeabilizzazione, che fanno parte del Kit IntraPrep (Beckman Coulter).

Le cellule sono state lavate con 1 mL di PBS1x freddo e sono state poste in provette da citofluorimetro e centrifugate a 800 rpm per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante sono state vortexate a secco. E' stato poi aggiunto goccia a goccia un fissativo (composto da formaldeide allo 0,5% in PBS1x) e i campioni sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente, in seguito è stato aggiunto 1 mL di PBS1x freddo ed è stata effettuata una centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti a +4°C. Dopo aver eliminato il surnatante, i tubi sono stati nuovamente vortexati a secco. In seguito sono stati aggiunti 100 µL di soluzione permeabilizzante e i campioni sono stati incubati 15 minuti a temperatura ambiente.

Per tarare lo strumento ed eliminare la fluorescenza di fondo, i campioni contenenti le cellule sono stati preparati in doppio; in un campione è stato aggiunto l'anticorpo per p-Akt (Rabbit IGg Alexa

Fluor 488 conjugate) ad una concentrazione pari a 50 ng/ μ L, mentre nell'altro campione è stato aggiunto un anticorpo irrilevante (Upstate #30491 Normal Rabbit IgG Alexa Fluor 488⁺ conjugate negative control) ad una concentrazione pari a 5 ng/ μ L. In seguito, entrambi i campioni sono stati incubati *overnight* a +4 °C. Il giorno successivo, le cellule sono state sottoposte ad un lavaggio con 1 mL di PBS1x freddo e centrifugati a 800rpm per 5 minuti a +4°C, vortexati e poi risospesi in 400 μ L di PBS1x freddo e analizzati al citofluorimetro.

8. Separazione delle cellule CD34⁺

Le cellule CD34⁺ sono state ottenute dalle cellule mononucleate totali dopo separazione immunomagnetica usando il kit MiniMACS per le cellule CD34 (Miltenyi Biotec), secondo le istruzioni della ditta produttrice.

In breve, le cellule sono state centrifugate a 800 rpm ed è poi stato eliminato il surnatante. Il *pellet* è poi stato risospeso in 300 μ L di tampone di eluizione (PBS pH 7.2, 0,5% BSA e 2mM EDTA); in seguito sono stati aggiunti 100 μ L di FcR Blocking Reagent e 100 μ L di biglie immunomagnetiche (MACS microbeads Miltenyi Biotec Germany) ogni 10⁸ cellule; il tutto è stato poi mescolato ed incubato 30 minuti a +4 °C. Successivamente le cellule sono state lavate in 1 mL di PBS1x ogni 10⁷ cellule e centrifugate a 800 rpm per 10 minuti; è stato poi eliminato il surnatante e il *pellet* è stato risospeso in 500 μ L di PBS1x. Come mostrato in Figura 16, la colonna di eluizione MS è stata posta nell'appropriato supporto nel campo magnetico. Successivamente, sono stati aggiunti 500 μ L di PBS1x per equilibrare la colonna. La sospensione cellulare è stata posta nella colonna, che ha trattenuto le cellule marcate e ha invece eluito quelle non marcate. La colonna è poi stata lavata 3 volte con il tampone di eluizione e la frazione di cellule non marcate è stata raccolta. La colonna è stata poi rimossa dal separatore magnetico e inserita in un tubo pulito. E' stato aggiunto 1 mL di tampone di eluizione e, applicando l'apposito stantuffo fornito dal kit, è stata immediatamente eluita la frazione marcata contenente cellule CD34⁺.

9. Saggio Clonogenico

Per analizzare l'attivazione dell'asse PI3K/Akt/mTOR nelle cellule staminali dei pazienti affetti da MDS, sono stati condotti esperimenti volti alla valutazione della capacità clonogenica delle cellule staminali dei pazienti.

Le cellule CD34⁺ estratte da campioni di midollo osseo di pazienti affetti da MDS e da donatori sani sono state risospese ad una concentrazione di 8x10³ cell/mL in terreno IMDM (Iscove's

Modified Dulbecco's Medium) addizionato con 2% FCS. La miscela contenente le cellule è poi stata aggiunta ad un terreno completo composto da metilcellulosa (MethoCult GF+ H4535, Stem Cell technologies), contenente diversi fattori di crescita emopoietici. Le cellule sono state piastrate in dish da 35mm in presenza di rapamicina o LY294002; successivamente i dish sono stati messi all'interno di un incubatore in atmosfera umidificata (5% CO₂, 37°C).

Dopo 14 giorni circa, le colonie (>50 cellule) e i cluster (<50 cellule) cresciuti, come quelli mostrati in Figura 15, sono stati osservati al microscopio ottico invertito e valutati morfologicamente secondo il metodo descritto da Nissen-Druey (Nissen-Druey et al., 2005), mentre l'analisi statistica è stata effettuata usando il software GraphPad Prism (v. 3.0).



Figura 15. Colonie cresciute in Metilcellulosa. Le colonie rosse sono eritrocitarie, mentre le colonie bianche sono monocitarie/granulocitiche.

10. Preparazione del lisato proteico totale

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 0.3×10^6 cellule/mL e lasciate crescere *overnight* a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state raccolte e centrifugate per 10 minuti a 1000rpm a temperatura ambiente, successivamente lavate in PBS1x e nuovamente centrifugate per 10 minuti a 1000rpm a temperatura ambiente. In seguito, dopo aver eliminato il surnatante, al *pellet* è stato aggiunto acido okadaico (20nM, Sigma Aldrich Corporation), DNAasi I (70 U/ml, Roche Diagnostics GmbH, Germany) ed il tampone di lisi composto da Tris-HCl 10mM pH 7.4 (Sigma-Aldrich Corporation); MgCl₂ 1mM (Merck, Darmstadt, Germany); EGTA 1mM (Sigma-Aldrich Corporation); Triton X-100 1% (Schwartz/Mann Biotech, Ohio, USA); saccarosio 0,25M (Sigma-Aldrich Corporation) e acqua bidistillata. Al tampone di lisi sono stati inoltre aggiunti: Na₃VO₄ 1mM (Sigma-Aldrich Corporation); NaF 50mM (Sigma-Aldrich Corporation); β-glicerolfosfato 1mM (Sigma-Aldrich Corporation); Na pirofosfato 25mM (Sigma-Aldrich Corporation). Al buffer

di lisi viene aggiunto un cocktail di inibitori per le fosfatasi (Roche) tra le quali la fosfatasi acida e alcalina, le fosfatasi delle proteine che si fosforilano sui residui di serina e di treonina (PP1, PP2A e PP2B) e quelle che si fosforilano sui residui di tirosina (PTP).

Il *pellet* è stato quindi risospeso ed i campioni sono stati incubati in ghiaccio per 15 minuti; successivamente sono stati effettuati 10 passaggi in siringa con ago 20-gauge. In seguito i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 10000 rpm a +4°C ed è stato raccolto il surnatante, contenente l'estratto di proteine, al quale è stato aggiunto il Sample Buffer 4x (SB, Sigma-Aldrich, Italy).

La concentrazione proteica dei campioni è stata quantificata secondo il Metodo di Lowry, che prevede la costruzione di una curva di taratura utilizzando concentrazioni note di BSA (Sigma-Aldrich, Italy) in tampone di lisi senza l'aggiunta di inibitori delle proteasi e fosfatasi. Anche in questo caso è stato aggiunto SB4x; i campioni e gli standards sono preparati con le soluzioni A, B e S contenuti nel Kit BioRad Pc Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). La lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro (Beckman Coulter) a 750 nm permette quindi la costruzione della curva di taratura standard, in base alla quale verrà determinata la concentrazione proteica.

11. Western Blotting

L'elettroforesi è stata effettuata su gel di poliacrilammide in sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). La separazione proteica è stata effettuata in cassette da elettroforesi (Amersham Biosciences UK Limited, Bucks, UK) alimentate da una corrente che permette la migrazione delle proteine verso l'elettrodo di carica opposta alla propria, che è negativa. I campioni sono stati caricati su gel con diverse percentuali di poliacrilammide, a seconda dei pesi molecolari delle proteine d'interesse.

Come mostrato in Figura 16, ogni gel è costituito da due componenti. Il primo è il *Running Gel*, che si trova nella parte sottostante ed è preparato con H₂O, acrilammide/bis-acrilammide (Sigma-Aldrich), Tris-HCl pH 8.8, SDS 10% (Fluka BioChemika, Svizzera). Inoltre, vengono aggiunti due catalizzatori della polimerizzazione: ammonio persolfato (APS; Sigma-Aldrich) e TEMED (Amersham Biosciences UK Limited, Bucks, UK). Il secondo componente, definito *Stacking Gel*, si trova nella parte superiore ed è su questo gel che vengono caricati i campioni. In particolare, lo *Stacking Gel* è preparato con H₂O, acrilammide/bis-acrilammide, Tris-HCl pH 6.8, SDS 10 %, APS e TEMED.

I campioni, precedentemente colorati con blu di bromofenolo (Sigma-Aldrich Corporation), che consente di seguire la loro migrazione durante la corsa elettroforetica, sono caricati in ogni pozzetto alla stessa quantità (50-80 µg), insieme ad uno standard dei pesi molecolari.

L'omogenato è stato separato in SDS-PAGE ossi elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil fosfato, agente denaturante in grado di interagire con le proteine in un rapporto costante 1.4g SDS ogni g di proteina. La separazione avviene quindi per differenza fra pesi molecolari visto che il rapporto massa carica per ogni proteina denaturata con SDS rimane costante. I gel utilizzati per la separazione delle proteine indagate sono ad una percentuale di 10-15% di acrilammide e la corsa viene settata a 300V e 32mAmp, mantenendo costante il voltaggio ed utilizzando un tampone per la corsa elettroforetica a pH 8.3 composto da SDS al 10%, Tris (Sigma-Aldrich) e glicina (Sigma-Aldrich). Quando si chiude il circuito, gli ioni Cl⁻ del tampone Tris-HCl pH 6,8 (gel di impilamento e soluzione dei campioni) formano un'onda veloce che si dirige verso il basso (polo positivo), seguita da un'onda di ioni glicina (tampone per la corsa), più grandi e più lenti. Tra queste due onde si forma una zona ad alto voltaggio, nel quale le proteine del campione formano bande strettissime, di pochi micrometri, e impilate l'una sull'altra. Queste bande possono quindi entrare nel gel di separazione una alla volta, dove trovano pH 8,8 e un campo elettrico uniforme che le separa secondo la carica, mentre il setaccio tridimensionale di acrilammide le separa secondo la grandezza. Il risultato finale è che ogni proteina, al termine dell'elettroforesi, ha percorso nel gel di separazione una distanza in mm proporzionale al suo peso molecolare.

Nel momento in cui il fronte di corsa ha raggiunto il limite inferiore del gel, è stata interrotta la corsa e le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Amersham Biosciences UK Limited) attraverso un Semidry Transblotter (Sigma-Aldrich Corporation), utilizzando un tampone di trasferimento costituito da metanolo al 10 % (Merck, Darmstadt, Germany), TrisHCl, glicina e H₂O a 100V, 56mAmp per circa 2 ore e mezzo; successivamente, per accertare il corretto trasferimento, la membrana è stata colorata con il colorante Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich Corporation), che si lega alle proteine in modo aspecifico.

Dopo il trasferimento, la membrana è stata decolorata con Tris 1M e poi incubata in un tampone di saturazione composto da PBS1x, 0,1% Tween-20 (PBS/T; Sigma-Aldrich) in 5% di latte scremato (non-fat dry milk) per 60 minuti a temperatura ambiente, per bloccare i siti di legame aspecifici dell'anticorpo. Successivamente, la membrana è stata incubata per tutta la notte a +4°C con gli anticorpi primari diretti contro le proteine d'interesse diluiti in PBS/T con 5% di albumina di siero bovino (BSA, Sigma-Aldrich). Il giorno successivo la membrana è stata lavata con PBS/T e nuovamente incubata per 60 minuti a temperatura ambiente con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA) e specifico per l'anticorpo primario, diluito in PBS/T e 5% di latte. Al termine del periodo d'incubazione, la membrana è stata sottoposta ad altri lavaggi prima in PBS/T e poi in PBS1x.

Il legame con l'anticorpo è stato visualizzato dopo incubazione con luminolo (#7003, LumiGlo, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA), una soluzione che contiene il substrato per la perossidasi e che reagendo con l'enzima induce una reazione di chemiluminescenza. Infine, le proteine visualizzate sulla membrana di nitrocellulosa sono state impressionate su lastre fotografiche (Kodak) racchiuse in una cassetta radiologica (Amersham Biosciences UK Limited, Bucks, UK) e sviluppate in camera oscura.

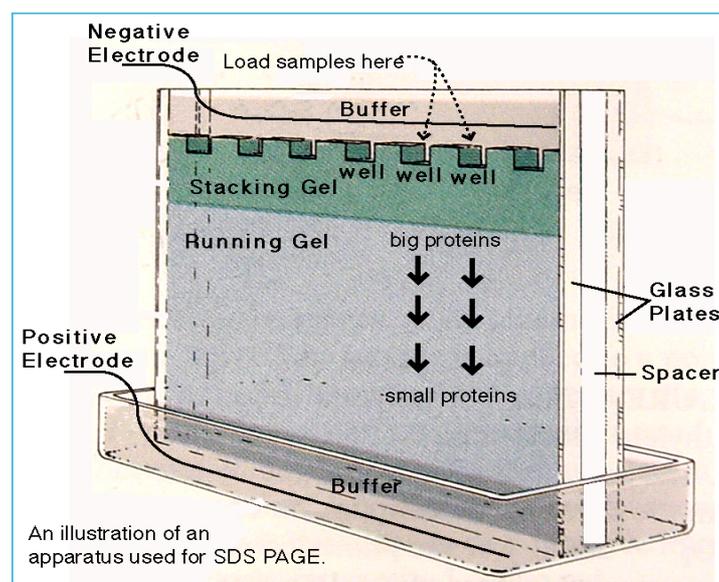


Figura 16. Rappresentazione schematica della struttura di un gel per la separazione SDS-PAGE.

Gli anticorpi primari utilizzati nella tecnica del Western Blotting sono gli stessi utilizzati per le analisi di immunocitochimica (AKT, pAkt (Ser473), mTOR, p-mTOR (Ser2448), p70S6K, p-p70S6K (Thr389), 4EBP1, p-4EBP1 (Ser65), tERK 1/2, PLC β 1, pERK 1/2 (Thr202/Thr204)), a diluizioni diverse secondo *datasheet*, con l'aggiunta della β -actina (Cell Signaling Tech., cod. 4967) utilizzata per la valutazione del bilanciamento delle cariche. Gli anticorpi secondari utilizzati invece sono IgG anti-rabbit o anti-mouse coniugati con la perossidasi (HRP, horseradish peroxidase) sempre della ditta Cell Signaling Technologies. (codice #7074 e #7076, rispettivamente).

12. Studio della presenza di isole CpG nel promotore putativo del gene della PI-PLC β 1

La sequenza genomica del gene della PI-PLC β 1 (GenBank Accession Number: AL-050323), dall'inizio fino all'ATG del gene (33.301 bp), è stata inserita nel software Methyl Primer Express v1.0 (Applied Biosystem) per verificare la presenza di eventuali isole CpG. Il software utilizzato permette di analizzare la presenza di eventuali regioni ad alta densità di CG, che possano essere considerate Isole CpG.

Per effettuare una buona quantificazione, è necessario avere un gene di riferimento endogeno, il cui stato di metilazione deve essere il più possibile stabile e non variare in seguito al trattamento. Il gene più adatto ad essere usato come riferimento si è dimostrato essere quello che codifica per la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH, FOR: 5'-TTTACATGTTCCAATATGATTCCA-3', REV: 5'-TGGAAGATGGTGGTGGGATT-3', ad una concentrazione finale di 900nM).

La linea cellulare HL60 è stata invece utilizzata come ulteriore controllo per l'affidabilità e riproducibilità del metodo, dato che è stato verificato che tale linea cellulare ha un alto grado di metilazione dell'isola 2 del promotore della PI-PLC β 1, mentre la linea cellulare MDA-MB-453 è stata utilizzata in quanto ha dimostrato avere un basso livello di metilazione sulla medesima regione. DNA universalmente metilato (Chemicon), sottoposto a modificazione con sodio bisolfito, è stato usato invece come controllo positivo per gli alleli metilati.

L'amplificazione è stata condotta caricando ogni campione su una piastra da 96 pozzetti (MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems) in un volume totale di reazione di 25 μ L. La corsa di Real-Time PCR è stata effettuata su uno strumento ABI Prism 7300 SDS (Applied Biosystems) impostando le seguenti condizioni di amplificazione: 50°C 2 minuti, 95°C 10 minuti seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

A fine corsa è stata poi condotta un'analisi delle curve di dissociazione per analizzare l'amplificato, in quanto il Sybr Green si intercala in modo aspecifico e rileva prodotti sia specifici (amplificato reale) che aspecifici (dimeri di *primers*). I prodotti di PCR sono inoltre stati sequenziati per avere la certezza di lavorare con il prodotto specifico. L'analisi quantitativa è stata eseguita tramite il metodo $\Delta\Delta$ Ct, mentre il software GraphPad Prism (v. 3.0) ha permesso di effettuare un'analisi statistica sui risultati ottenuti.

16. Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

L'RNA totale è stato isolato dalla linea cellulare HL60, dalle cellule mononucleate estratte da pazienti affetti da MDS e da donatori sani usando il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen Ltd, Valencia, CA, USA) secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Le tracce di DNA genomico sono state eliminate trattando i campioni con DNAsi I (Qiagen Ltd).

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 500 ng di RNA totale usando 200U di M-MLV retrotrascrittasi, 0.5 μ g di Primers oligodT, 25U di inibitore delle ribonucleasi, ogni dNTP alla concentrazione di 10 mM per 1h a 42°C.

17. Real-Time PCR con sonde TaqMan

L'espressione genica delle due forme trascrizionali del gene della PI-PLC β 1 è stata quantificata attraverso un metodo di Real-Time PCR e l'uso di sonde TaqMan specifiche per le due forme trascrizionali della PI-PLC β 1 (Assay n°Hs01001939_m1 e Hs01008373_m1, Applied Biosystems). Oltre ad esse, per effettuare una buona quantificazione, è necessario avere un gene di riferimento endogeno, la cui espressione deve essere il più possibile stabile e non variare in seguito al trattamento. Quindi, per stabilire quale fosse il gene *housekeeping* più adatto, è stata eseguita una reazione utilizzando una piastra fornita dalla ditta Applied Biosystems che contiene 11 geni comunemente usati come endogeni. Da tale indagine è risultato che il gene più adatto ad essere usato come riferimento fosse quello che codifica per la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH, Assay n°Hs99999905_m1, Applied Biosystems). La linea cellulare HL60 è stata invece utilizzata come ulteriore controllo per l'affidabilità e riproducibilità del metodo, dato che è noto che tale linea cellulare ha una bassa espressione di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLC β 1 (Lukinovic-Skudar V et al, 2005).

L'amplificazione è stata condotta caricando ogni campione su una piastra da 96 pozzetti (MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems) con volume totale di reazione di 25 μ L. La corsa di Real-Time PCR è stata effettuata su uno strumento ABI Prism 7300 SDS (Applied Biosystems) impostando le seguenti condizioni di amplificazione: 50°C 2 minuti, 95°C 10 minuti seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

L'analisi quantitativa è stata eseguita tramite il metodo $\Delta\Delta$ Ct, mentre il software GraphPad Prism (v. 3.0) ha permesso di effettuare un'analisi statistica sui risultati ottenuti.

18. Clonaggio dell' isola 2 CpG del promotore del gene della PI-PLC β 1

18.1 Amplificazione del Frammento dell'isola 2 del promotore del gene della PI-PLC β 1

Il frammento del promotore del gene della PI-PLC β 1 contenente la sequenza dell'isola 2 è stato amplificato mediante una reazione di PCR in modo da ottenere un amplificato di circa 3000 bp. In particolare, ai *primers* utilizzati sono state aggiunte due code contenenti le sequenze degli enzimi di restrizione KpnI (al Primer Forward) e BglII (al Primer Reverse), che non sono presenti nel Polylinker del vettore pCR4-Topo ma sono presenti nel vettore pSEAP2-Basic, in modo da poter effettuare il clonaggio nei vettori utilizzati.

Le sequenze dei *primers* utilizzate sono le seguenti:

FOR: 5'-GGTACCGACAATTGAGAAGTTCTGGAGC-3'

REV: 5'-AGATCTAAGTGTTTTGAACTTCAGGTCCT-3'

La regione così amplificata è quella che va da -2469 bp a +559 bp rispetto all'ATG del gene, per un totale di circa 3000 bp.

18.2 Colture batteriche

L'utilizzo del DNA plasmidico prevede l'impiego di particolari terreni di coltura, in grado di soddisfare le richieste nutritive delle cellule batteriche trasformate con i plasmidi stessi.

Il primo terreno utilizzato è un terreno liquido denominato Brodo Luria-Bertani (LB): si tratta di un terreno composto da Bactotriptone (20 g/L), Estratto di Lievito (5 g/L), NaCl (5 g/L) e NaOH 1M (100 μ l /100 ml). Normalmente il terreno è stato conservato a 4°C senza antibiotici, perché nel tempo si possono degradare, per cui l'antibiotico è aggiunto al momento dell'uso. La concentrazione finale dell'antibiotico è 50 μ g/ml, a partire da uno stock preparato ad una concentrazione di 10 mg/ml.

Per effettuare la trasformazione è stato impiegato un altro tipo di terreno liquido, chiamato SOC. Tale terreno è costituito da Bactotriptone (20g/L), Estratto di lievito (5 g/L), NaCl (0,5 g/L), KCl 1M (2,5 ml/L). Al momento dell'uso sono stati aggiunti MgCl₂ 1M (per una concentrazione finale di 10 mM), MgSO₄ 1M (per una concentrazione finale di 10 mM) e glucosio al 20%p/v (per una concentrazione finale dell' 1%p/v). Le piastre batteriche sono state preparate aggiungendo ai componenti del brodo LB 15 g/L di Agar. Poi, solo quando il terreno ha raggiunto la temperatura di 50-55°C, si sono aggiunti gli antibiotici necessari alla selezione dei cloni positivi. In seguito, sono stati versati circa 10-12 ml di soluzione all'interno di piastre batteriche, del diametro di 85 mm. Una volta che il terreno si è solidificato, le piastre sono state conservate a 4°C.

18.3 Ligasi di un frammento di DNA in un plasmide

Per clonare un frammento in un vettore plasmidico, occorre innanzitutto linearizzare il vettore ed il frammento da clonare. La reazione che permette di inserire il frammento nel vettore è chiamata ligasi, perché avviene tramite l'uso di un enzima, denominato appunto DNA ligasi, che permette di legare estremità sporgenti di DNA.

In questo studio il frammento del promotore del gene della PLCbeta1 è stato sub-clonato nel vettore pCR4-Topo (FIG. 17) e poi clonato nel vettore pSEAP2-Basic (FIG: 18).

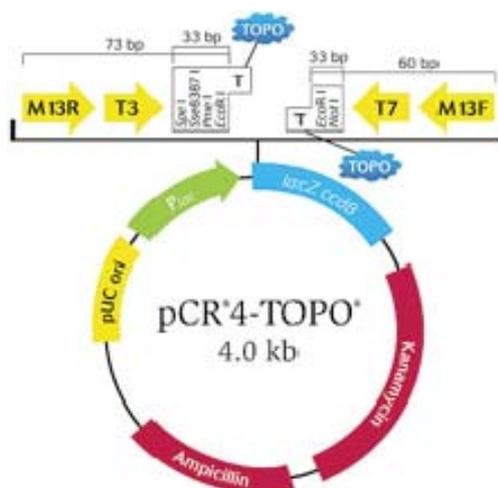


Figura 17. Struttura del vettore pCR4-TOPO. È presente il gene per la resistenza all'antibiotico kanamicina, che serve per selezionare i cloni positivi.

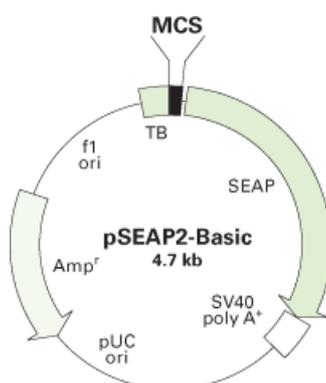


Figura 18. Struttura del vettore pSEAP2-Basic. È presente il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina, che serve per selezionare i cloni positivi.

Nel polylinker del vettore pCR4-Topo non sono presenti i siti per gli enzimi di restrizione KpnI e BglII; ma sfruttando le sequenze aggiunte ai primers per l'amplificazione del frammento è stato possibile amplificare e successivamente tagliare il frammento del promotore dell'Isola 2 del gene della PI-PLC β 1 inserito all'interno del vettore. Invece, nel polylinker del vettore pSEAP2-Basic sono presenti i siti per gli enzimi di restrizione Kpn I e BglII; per cui sfruttando le estremità coesive di tali enzimi è stato possibile clonare il frammento del promotore dell'Isola 2 del gene della

PLCbeta1 all'interno del vettore. La reazione di Ligasi è avvenuta sfruttando il Kit Rapid DNA Ligation kit della ditta Roche, secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

18.4 Trasformazione di una coltura batterica

La trasformazione batterica permette di inserire un plasmide in batteri competenti. In particolare, sono stati utilizzati batteri di E.Coli, resi chimicamente competenti e si sono seguiti i protocolli standard per la trasformazione batterica.

18.5 Lisi alcalina per l'estrazione del DNA plasmidico da batteri

Tale procedimento serve per estrarre un plasmide da una coltura batterica di pochi mL e serve per verificare la presenza del plasmide desiderato all'interno di batteri trasformati. In questo studio è stato utilizzato il kit Qiagen Plasmid MiniPrep (Qiagen) secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

18.6 Digestione del DNA plasmidico con enzimi di restrizione

Dopo la trasformazione e l'estrazione del plasmide, per verificare la presenza dell'inserto all'interno del vettore è stata effettuata una reazione di digestione enzimatica. E' possibile, infatti, sfruttare la presenza di siti per enzimi di restrizione, che tagliano il DNA in corrispondenza di sequenze particolari. Conoscendo la sequenza del plasmide e dell'inserto, è quindi possibile verificare la presenza sia del plasmide che dell'inserto.

La reazione di digestione enzimatica è stata allestita in ghiaccio aggiungendo ad una provetta eppendorf 1 µl di enzima di restrizione (KpnI e BglII), 1 µl di tampone di reazione 10 x (per una concentrazione finale di 1x), circa 100-200 ng di DNA, ed acqua priva di DNAsi e RNAsi per un volume totale di 10 µl. La miscela è incubata a 37°C per un'ora, in modo che gli enzimi di restrizione possano funzionare. In seguito, gli enzimi sono stati inattivati, portando la reazione a 65°C per 10 minuti, dopodiché i prodotti sono analizzati mediante un gel di agarosio all'1% (p/v) in tampone TAE 1x.

18.7 Purificazione del DNA plasmidico

Per l'estrazione e la purificazione di un plasmide da cellule batteriche si è utilizzato il kit Qiagen Plasmid Maxi Prep (Qiagen), che permette di ottenere notevoli quantità di DNA plasmidico, secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

18.8 Metilazione *in vitro*

2 µg di DNA del plasmide SEAP, in cui è stato clonato il promotore della PI-PLCβ1, vengono metilati *in vitro* grazie all'enzima M.SssI Metiltransferasi (New England BioLabs) utilizzando come donatore di gruppi metilici il SAM (S-adenosil metionina) che cede all'enzima un gruppo metile reattivo legato allo zolfo. Tale reazione avviene con 12 U di M.SssI e 640 µM di SAM a 37°C per un massimo di 4 ore a 37°C, tempo dopo il quale il SAM non è più stabile. Per terminare la reazione la temperatura è alzata a 65°C per 20 minuti. Il prodotto metilato *in vitro* viene poi purificato con il Kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen) e il successo della metilazione viene verificato sia con digestione di enzimi di restrizione metilazione-sensibili sia con Real-Time PCR MSP.

18.9 Trasfezione e saggio della fosfatasi alcalina

Le cellule HL60, seminate in piastra da 24 pozzetti al 50-60% della confluenza, sono state trasfettate con il DNA plasmidico PI-PLCβ1 promoter/SEAP wild type (1µg/pozzetto), con il PI-PLCβ1 promoter/SEAP metilato *in vitro* (1µg/pozzetto), con il *mock* pSEAP2-Basic vector (1µg/pozzetto) e con il plasmide di controllo pmaxGFP attraverso il metodo per elettroporazione (AMAXA) con il kit V, seguendo il programma T-19. Dopo 16-18 h dalla trasfezione si preleva da ogni campione 100 µl di surnatante per verificare la quantità di fosfatasi alcalina presente, secondo le indicazioni del kit Great EscAPe SEAP della ditta Clontech. In breve, il surnatante viene inattivato a 65°C per 30 min in modo da disattivare le fosfatasi endogene e si aggiunge il PNPP (p-nitrofenilfosfato) (Sigma-Aldrich) il quale, in presenza di fosfatasi alcalina, viene idrolizzato a p-nitrofenolo dalla tipica colorazione gialla. Dopo un'incubazione al buio di 30 min a temperatura ambiente si effettua una lettura allo spettrofotometro a 405 nm. L'intensità della colorazione gialla sarà proporzionale all'attività della fosfatasi alcalina secreta.

Le cellule sono state poi trattate con Azacitidina (Sigma-Aldrich) 5 µM per 24 h e si è rivalutato il livello della fosfatasi alcalina nel surnatante nel modo sopra descritto.

19. Saggio MTT

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico che permette di valutare l'attività metabolica delle cellule e si basa sulla degradazione del sale di tetrazolio (MTT) a cristalli di formazano da parte delle cellule metabolicamente attive, che utilizzano per la reazione l'enzima reduttasi ed i cofattori NADH e NADPH. Le cellule HL60 e MDA-MB-453 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (Nunc, Rochester, NY), alla concentrazione di $2,5 \times 10^4$ cellule in 100 µl per pozzetto e tenute in

coltura per tutta la notte per permettere la crescita. Successivamente, le cellule sono state trattate con Azacitidina (Sigma-Aldrich) a diverse concentrazioni (1, 3, 5 μM) per 24h. Alla fine del trattamento sono stati aggiunti in ogni pozzetto 10 μl del reagente 1 del kit MTT (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germania) e la piastra è stata nuovamente incubata per 4 ore in atmosfera umidificata a 37°C. Questo periodo d'incubazione consente alle cellule metabolicamente attive di metabolizzare il sale di tetrazolio a cristalli di formazano, che sono stati solubilizzati con l'aggiunta di 100 μl di soluzione di solubilizzazione (reagente 2 del kit MTT) dopo un'incubazione per tutta la notte a 37°C. L'attività metabolica è stata valutata mediante lettura allo spettrofotometro ELISA Reader (Bio-Rad) della densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 575 nm. Per ciascun esperimento, ogni campione è stato seminato in triplo per l'elaborazione statistica dei dati. La percentuale delle cellule vitali è stata calcolata mediante il rapporto tra la media dell'assorbanza delle cellule trattate e la media dell'assorbanza delle cellule di controllo.

RISULTATI

1. Studio della Specificità degli Anticorpi della via di traduzione del segnale Akt/mTOR mediante Analisi Immunocitochimica e Western Blotting su Linee Cellulari

Poichè in molti casi il numero di cellule mononucleate estratte dai pazienti affetti da MDS è molto basso, gli studi riguardanti l'espressione proteica delle proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale esaminate in questo studio sono stati condotti soltanto tramite analisi immunocitochimica. Pertanto, è stato necessario effettuare una serie di esperimenti per valutare la specificità degli anticorpi usati nei successivi esperimenti; tali analisi sono state condotte su cellule CEM, che hanno un'alta espressione di p-Akt (Mantovani et al., 2006), così come su cellule HL60, che mostrano una scarsa attivazione di tale via (Tabellini et al., 2005).

Per quanto riguarda l'analisi dei livelli di espressione e di attivazione (fosforilazione), di Akt e della via mTOR/p70S6K/p4E-BP1, sono stati eseguiti degli esperimenti anche mediante Western Blotting. Mediante l'utilizzo di un anticorpo diretto contro Akt si è visto che esso era espresso sia nelle cellule CEM che nelle cellule HL60. L'attivazione della proteina, rivelata mediante l'uso di un anticorpo specifico verso la forma fosforilata di Akt nel residuo Ser473, era infatti presente nelle cellule CEM, ma non nelle cellule HL60, che sono state quindi considerate rispettivamente come riferimento positivo e negativo per i successivi esperimenti di immunocitochimica. Inoltre, è stata studiata anche l'attivazione di Erk1/2 nelle suddette linee cellulari, dal momento che è stato dimostrato che Akt interagisce con Erk1/2 (Ricciardi et al., 2005); Akt può infatti fosforilare e regolare negativamente Raf, che a sua volta attiva la via di segnalazione MEK/Erk1/2. I risultati ottenuti, utilizzando un anticorpo specifico verso i residui fosforilati Thr202/Tyr204, mostrano che nelle cellule CEM la via di sopravvivenza Erk1/2 è scarsamente attivata, mentre nelle cellule HL60 sono presenti livelli maggiori di proteina fosforilata. In tutte le analisi in Western Blotting eseguite, la β -actina è stata utilizzata per stabilire se eventuali differenze di espressione delle proteine in esame non fossero dovute a differenze di carica nella corsa elettroforetica (Figura 19).

Dal momento che uno dei bersagli molecolari a valle di Akt è mTOR, a sua volta coinvolto in una via di segnalazione cellulare, è stata verificata anche la specificità degli anticorpi coinvolti in tale asse di attivazione: p-mTOR, p-p70S6K e p-4E-BP1 (Figura 19). Anche in questo caso le indagini sono state eseguite con metodi di Western Blotting e di immunocitochimica; l'attivazione dell'asse mTOR/p70S6K/4EBP1 è stata osservata nelle cellule CEM, mentre non era presente nella linea cellulare HL60.

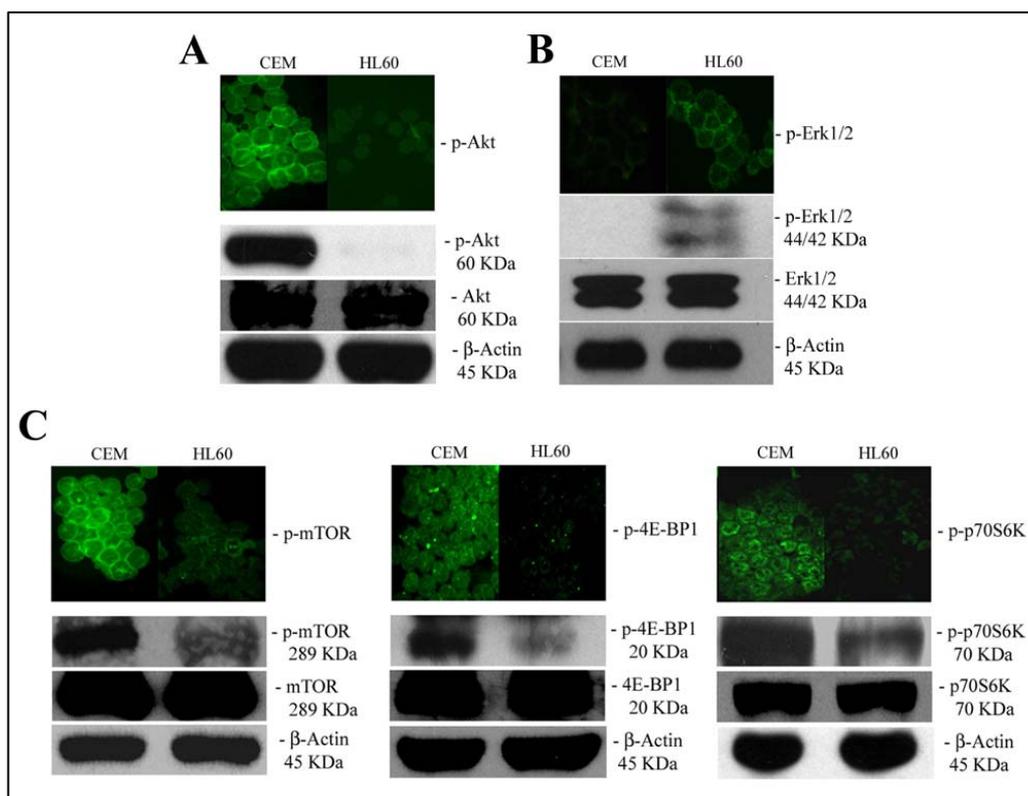


Figura 19. Stato di attivazione della via Akt/mTOR nelle cellule CEM e HL60. Analisi mediate Western Blotting e Immunocitochimica (Ingrandimento originale x 600) condotta su cellule CEM e HL60. Sono stati caricati 75 µg di proteina per ogni campione analizzato. (A) Ser473 p-Akt e Akt totale; (B) Thr202/Tyr204 p-Erk1/2 e Erk1/2 totale; (C) Ser2448 p-mTOR e mTOR totale; Ser65 p-4E-BP1 e 4E-BP1 totale; Thr389 p-p70S6K e p70S6K totale. In condizioni basali, le cellule CEM presentano scarsi livelli di p-Erk1/2, mentre le cellule HL60 mostrano un'intensità maggiore. D'altro canto, nelle cellule HL60 non c'è attivazione della via Akt/mTOR, mentre la linea cellulare CEM mostra attivazione di tale via di sopravvivenza, con alti livelli di p-Akt, p-mTOR, p-p70S6K e p-4EBP1. La β-actina è stata usata come gene di riferimento per controllare le differenze di carica.

2. Studio dell'Espressione Proteica di Akt nelle MDS mediante Analisi Immunocitochimica

Come già evidenziato in precedenza, Akt si trova al centro di una complessa rete di vie di trasduzione del segnale che hanno come effetto finale quello di agire sui processi di proliferazione ed apoptosi cellulare.

In particolare, studi recenti (Nyakern et al., 2006) hanno mostrato che Akt poteva essere attivato in pazienti affetti da MDS, soprattutto nei casi ad alto rischio di evoluzione in AML, indicando quindi un coinvolgimento di tale via nella patologia in esame.

Sulle cellule mononucleate di alcuni tra i pazienti affetti da MDS inseriti in questo studio è stata quindi effettuata un'indagine immunocitochimica per determinare i livelli di p-Akt, in modo da stabilire lo stato di attivazione di tale proteina nei casi analizzati.

I pazienti esaminati presentano tutti una diagnosi di MDS ad alto o basso rischio, ma sono stati scelti in modo casuale, per esempio non tenendo conto del cariotipo, dal momento che l'unico criterio di inclusione era rappresentato dal fatto di poter avere prelievi di sangue midollare, in modo che le analisi fossero condotte nelle stesse condizioni sperimentali.

Come mostrato in Figura 23, i donatori sani presentano una scarsa espressione di p-Akt, che invece è maggiore nei pazienti affetti da MDS, con i casi ad alto rischio che mostrano livelli di attivazione più elevati rispetto ai pazienti affetti da MDS a basso rischio. Gli anticorpi usati sono specifici, in quanto si può vedere che la marcatura è prevalentemente a livello citoplasmatico.

Inoltre, sono state effettuate anche analisi con anticorpi specifici per la forma totale di p-Akt, in modo da verificare che l'attivazione fosse specifica (Figura 20). I risultati ottenuti da quest'indagine mostrano che i livelli di Akt totale restano invariati, non essendoci differenza tra donatori sani e pazienti affetti da MDS, indicando quindi che l'attivazione di Akt è specifica.

Le Tabelle 5 e 6 mostrano le caratteristiche dei pazienti di cui è stata studiata la via di attivazione di Akt e i risultati ottenuti dalle analisi immunocitochimiche per ciascun paziente esaminato, in una scala arbitraria che assegna 0 al controllo negativo (cellule HL60) e 5 al controllo positivo (cellule CEM). Come si può vedere, i pazienti che mostrano livelli di p-Akt maggiori o uguali a 3 presentano attivazione della via mTOR/p S6K/p4EBP1, mentre pazienti con valori di p-Akt minori di 3 non hanno alti livelli di fosforilazione nelle proteine esaminate.

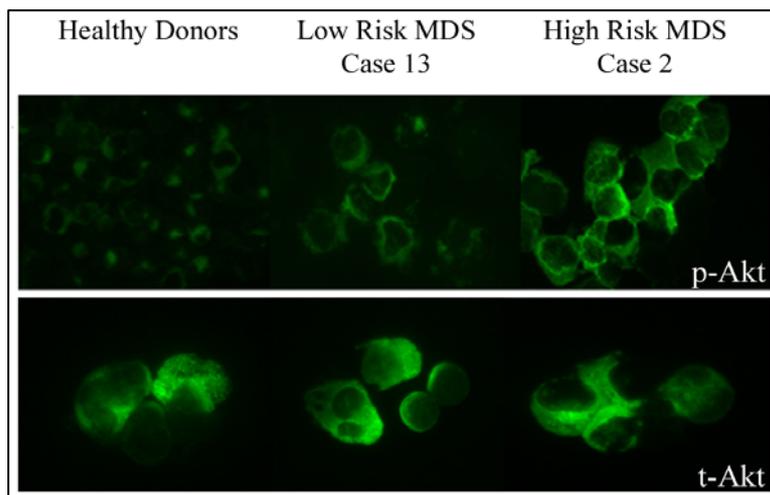


Figura 20. Analisi immunocitochimica di p-Akt in pazienti affetti da MDS. L'espressione proteica di p-Akt osservata nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio risulta maggiore rispetto a quella osservata nei donatori sani, indicando attivazione delle vie di segnalazione Akt-dipendenti. I pazienti affetti da MDS a basso rischio hanno un'espressione di p-Akt intermedia, che indica una lieve attivazione delle suddette vie.

Tabella 5. Caratteristiche dei pazienti affetti da MDS di cui è stata studiata l'attivazione dell'asse Akt/mTOR.

Characteristics	
General	
No. patients	20
Male/female ratio	16:4
Median age, years (range)	70.1 (53-79)
Category	
High risk MDS*	15
Low risk MDS*	5
Karyotype	
Diploid	13
Monosomy 7	1
Trisomy 8	3
Complex†	3

*Raggruppamento secondo la classificazione International Prognostic Scoring System (IPSS)

†Più di tre aberrazioni cromosomiche

Tabella 6. Espressione di Ser473 p-Akt, Ser2448 p-mTOR, Ser65 p-4E-BP1 and Thr389 p-p70S6K in pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio.

Case	Age	Diagnosis	Karyotype	PI3K Mutations	Cells	p-Akt	p-mTOR	p-p4E-BP1	p-p70S6K	p-Erk1/2
1	63	High risk MDS	46,XY	None	BMMCs	3	3	3	4	1
2	63	High risk MDS	54,XXY Complex	None	BMMCs	4	3	3	4	2
3	72	High risk MDS	47,XY (+8)	None	BMMCs	3	3	4	5	1
4	70	High risk MDS	46,XX	None	BMMCs	2	3	4	5	2
5	70	Low risk MDS	46,XY	None	BMMCs	1	1	1	1	3
6	76	Low risk MDS	46,XY	None	BMMCs	1	1	2	1	3
7	72	High risk MDS	46,XY	None	BMMCs	4	5	4	5	2
8	79	High risk MDS	46,XY Complex	None	BMMCs	3	2	3	2	1
9	63	High risk MDS	46,XY	None	BMMCs	2	3	3	4	2
10*	53	High risk MDS	45,XX (-7)	None	BMMCs	4	3	4	4	2
11*	69	High risk MDS	47,XY (+8)	None	BMMCs	5	4	4	5	1
12*	65	High risk MDS	47,XX (+8)	None	BMMCs	4	4	4	4	1
13	72	Low risk MDS	46,XY	None	BMMCs	1	1	2	1	3
14	79	High risk MDS	46,XY Complex	None	BMMCs	3	3	3	3	2
15	76	Low risk MDS	46,XY	None	BMMCs	1	1	2	1	4
16*	78	High risk MDS	46,XY	None	BMMCs	3	2	2	2	1
17	77	Low risk MDS	46,XY	None	BMMCs	1	1	1	1	4
18	63	High risk MDS	46,XY	None	BMMCs	3	4	5	5	2
19*	70	High risk MDS	46,XY	None	BMMCs	5	4	4	5	1
20	72	High risk MDS	46,XX	None	BMMCs	3	5	4	5	2

*Pazienti con evoluzione in AML. BMMCs: Cellule mononucleate derivanti da campioni di midollo osseo. Quantificazione dell'intensità del segnale: cellule CEM (valore arbitrario 5) sono considerate come controllo positivo, mentre le cellule HL60 sono considerate come controllo negativo (valore arbitrario 0).

3. Studio dell'Espressione Proteica di alcuni bersagli molecolari a valle di Akt mediante Analisi Immunocitochimica: asse di attivazione mTOR/4E-BP1/p70S6K nelle MDS

Essendo mTOR uno dei bersagli molecolari a valle di Akt, è stata studiata l'espressione di tale proteina sia in donatori sani che in pazienti affetti da MDS, attraverso metodiche di immunocitochimica. I pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano alti livelli di Ser2448 p-

mTOR, mentre i donatori sani e i pazienti affetti da MDS a basso rischio presentano una minore attivazione (Figura 21A).

Dal momento che mTOR può, a sua volta, interagire con altri due effettori a valle, 4EBP1 e p70S6K, è stata analizzata anche l'attivazione di tali proteine, mediante l'uso di anticorpi specifici verso residui fosforilati che indicano attivazione di tale via di trasduzione. Come mostrato in Figura 21C, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio presentano attivazione di tale via, mentre sia i donatori sani che i pazienti affetti da MDS a basso rischio hanno bassi livelli di fosforilazione a carico di tali proteine. L'immagine è rappresentativa delle diverse analisi effettuate: i casi di MDS ad alto rischio mostrano sempre una maggiore intensità delle proteine dell'asse Akt/mTOR rispetto ai donatori sani e ai casi di MDS a basso rischio, che invece hanno intensità minori. I dati ottenuti per ogni singolo paziente sono riportati nella Tabella 6.

L'attivazione è specifica, in quanto analisi effettuate con gli anticorpi contro la forma totale delle proteine esaminate, non hanno mostrato variazioni sensibili tra i pazienti affetti da MDS, sia a basso che ad alto rischio, e i donatori sani.

Infine, come precedentemente evidenziato, è noto che Akt può interagire con Erk1/2. Quindi sono stati condotti esperimenti di immunocitochimica per valutare l'attivazione di Erk1/2 nei donatori sani e nei pazienti affetti da MDS. Come mostrato in Figura 21B, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio presentano scarse quantità di proteina fosforilata, mentre i donatori sani e i pazienti affetti da MDS a basso rischio mostrano attivazione di tale via di segnalazione. Le Tabelle 5 e 6 mostrano le caratteristiche dei pazienti di cui è stata studiata la via di attivazione di Akt e i risultati ottenuti per ciascun paziente esaminato, in una scala arbitraria che assegna 0 al controllo negativo (cellule HL60) e 5 al controllo positivo (cellule CEM).

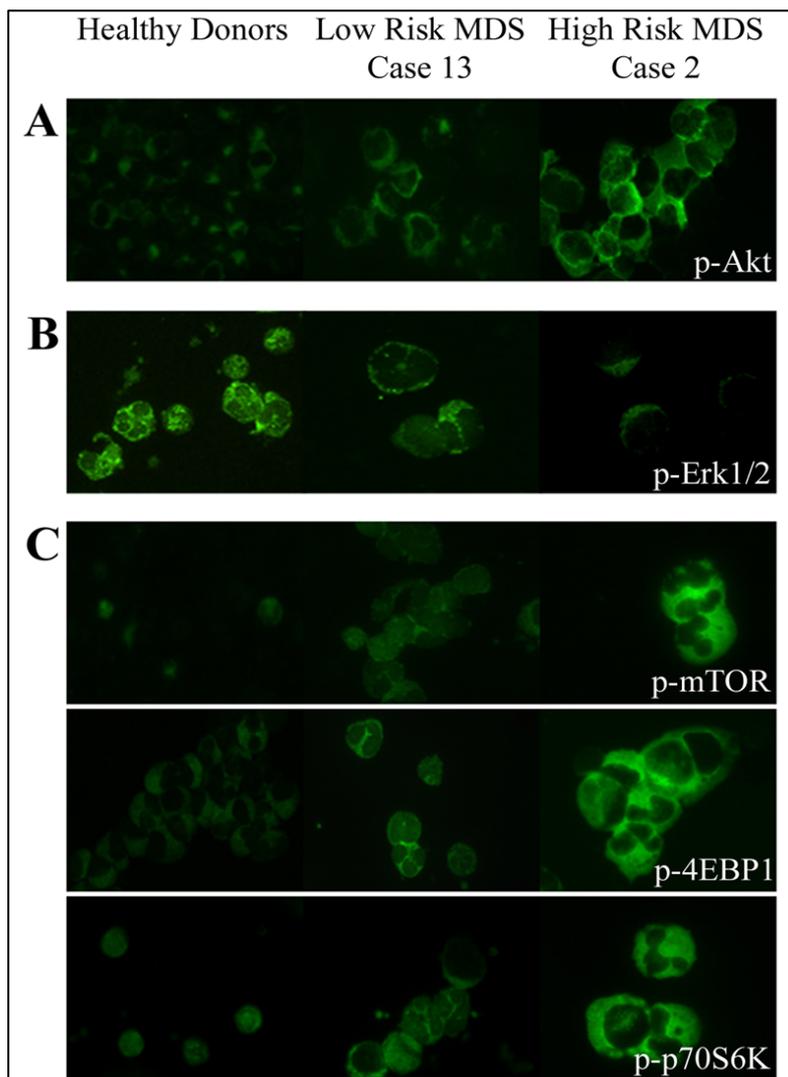


Figura 21. Analisi Immunocitochimica di p-Akt, p-mTOR; p-4E-BP1 e p-p70S6K in donatori sani e pazienti affetti da MDS. Analisi Immunocitochimica (Ingrandimento originale x 600) condotta su donatori sani e pazienti affetti da MDS, di cui sono raffigurati due casi rappresentativi: uno per i pazienti a basso rischio (Caso n. 13) e uno ad alto rischio (Caso n. 2) (A) Ser473 p-Akt; (B) Thr202/Tyr204 p-Erk1/2; (C) Ser2448 p-mTOR , Ser65 p-4E-BP1 e Thr389 p-p70S6K.

4. Analisi dell'espressione di Akt e mTOR nei *lineage* differenziativi mieloide ed eritroide

A partire dai risultati ottenuti mediante le analisi immunocitochimiche, che evidenziavano un'attivazione della via di trasduzione del segnale Akt/mTOR, sono stati condotti alcuni esperimenti per identificare quale fosse il *lineage* emopoietico coinvolto, in modo da valutare il coinvolgimento delle cellule staminali emopoietiche. Per questo motivo è stato utilizzato un marcatore specifico del *lineage* mieloide, CD33 (Knapp et al., 1994) ed uno del *lineage* eritroide, CD71 (Kowal-Vern et al., 2000). Come mostrato in Figura 22, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio che erano positivi per CD33 mostravano un'alta espressione sia di p-Akt che di p-mTOR; al

contrario, le cellule che presentavano alti livelli di CD71 mostravano scarse quantità di p-Akt e di p-mTOR, indicando quindi che il lineage coinvolto nell'attivazione dell'asse Akt/mTOR era quello delle cellule staminali mieloidi.

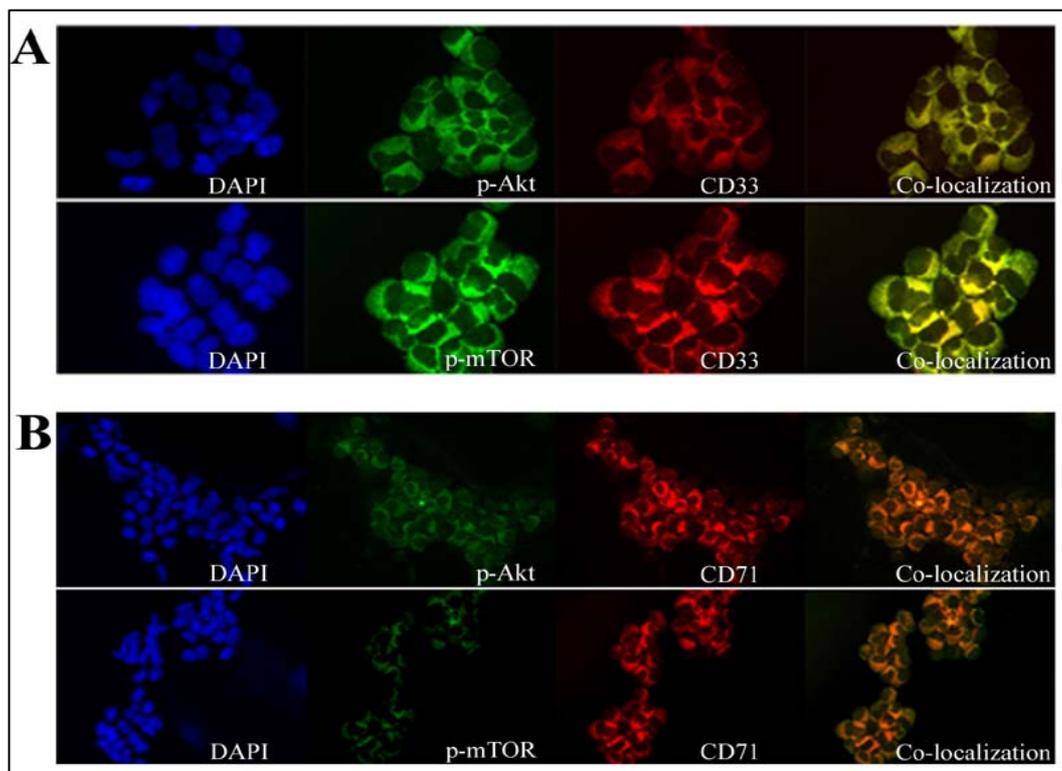


Figura 22. Identificazione del lineage coinvolto nell'attivazione di Akt e nelle MDS ad alto rischio. Analisi Immunocitochimica (Ingrandimento originale x 600) condotta su pazienti affetti da MDS ad alto rischio. I nuclei sono visualizzati mediante colorazione con DAPI (segnale blu) (A) Ser473 p-Akt o Ser2448 p-mTOR in pazienti affetti da MDS ad alto rischio (segnale verde). Le cellule CD33⁺ sono state identificate mediante l'uso di un anticorpo specifico coniugato con PE (segnale rosso). La sovrapposizione delle due immagini indica lo stato di co-localizzazione delle proteine esaminate (segnale giallo). (B) Ser473 p-Akt o Ser2448 p-mTOR in pazienti affetti da MDS ad alto rischio (segnale verde). Le cellule CD71⁺ sono state identificate mediante l'uso di un anticorpo specifico coniugato con PE (segnale rosso). La sovrapposizione delle due immagini indica lo stato di co-localizzazione delle proteine esaminate (segnale arancione).

5. La rapamicina induce apoptosi nelle cellule CD33⁺ nelle MDS ad alto rischio

Le frazioni CD33⁺ e CD33⁻ sono state isolate da cellule mononucleate totali di prelievi di sangue midollare, in modo da studiare il ruolo delle cellule staminali mieloidi nell'attivazione dell'asse Akt/mTOR. Tali frazioni cellulari sono state sottoposte a trattamento con rapamicina per 48h, in modo da inibire l'attivazione di mTOR, oppure LY294002, che inibisce in modo selettivo PI3K. La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata mediante analisi al citofluorimetro.

In condizioni basali, sia i donatori sani che i pazienti affetti da MDS a basso rischio presentano una percentuale di cellule apoptotiche più alta rispetto a pazienti affetti da MDS ad alto rischio. In

particolare, l'alta percentuale di cellule apoptotiche presente nei pazienti affetti da MDS a basso rischio in condizioni basali rispecchia le caratteristiche di questo tipo di patologia, che presenta una particolarmente elevata apoptosi e una bassa proliferazione cellulare. E' da notare, invece, che i pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano una scarsa apoptosi in condizioni basali, indicando quindi l'attivazione di meccanismi di proliferazione e sopravvivenza cellulare.

Per quanto riguarda l'effetto della rapamicina, essa ha indotto piccole variazioni nelle percentuali di cellule apoptotiche dei donatori sani e dei pazienti affetti da MDS a basso rischio, sia nelle cellule CD33⁺ che nelle cellule CD33⁻. Al contrario, le cellule dei pazienti affetti da MDS ad alto rischio sembrano più sensibili a tale trattamento, con un aumento significativo nella frazione di cellule CD33⁺ rispetto alle cellule CD33⁻ (Figura 23A). Inoltre, poiché uno studio recente ha evidenziato che la rapamicina può indurre attivazione di Akt attraverso un meccanismo di *feedback* negativo, sono stati analizzati i livelli di p-Akt nelle stesse cellule sottoposte a tale trattamento. Nelle suddette condizioni sperimentali però, l'inibizione di mTOR mediante rapamicina non ha indotto ulteriore espressione di p-Akt (Figura 23B).

Al contrario, il trattamento con LY294002 non ha indotto variazioni significative nella percentuale di cellule apoptotiche dei soggetti esaminati, mentre le cellule CEM, usate come controllo, hanno mostrato un'alta sensibilità verso tale sostanza (Figura 23C). Considerando che LY294002 non ha avuto effetti significativi sulle percentuali di cellule apoptotiche delle frazioni CD33⁺ dei pazienti affetti da MDS, è stata analizzata anche la sequenza della subunità catalitica p110 α del gene della PI3K, dal momento che mutazioni attivanti di tale gene sono state dimostrate in diversi tipi di patologie tumorali (Bousquet et al., 2005; Liu and Roberts, 2006). In ogni caso, nessun paziente analizzato ha evidenziato la presenza di mutazioni a carico del gene esaminato (Tabella 6).

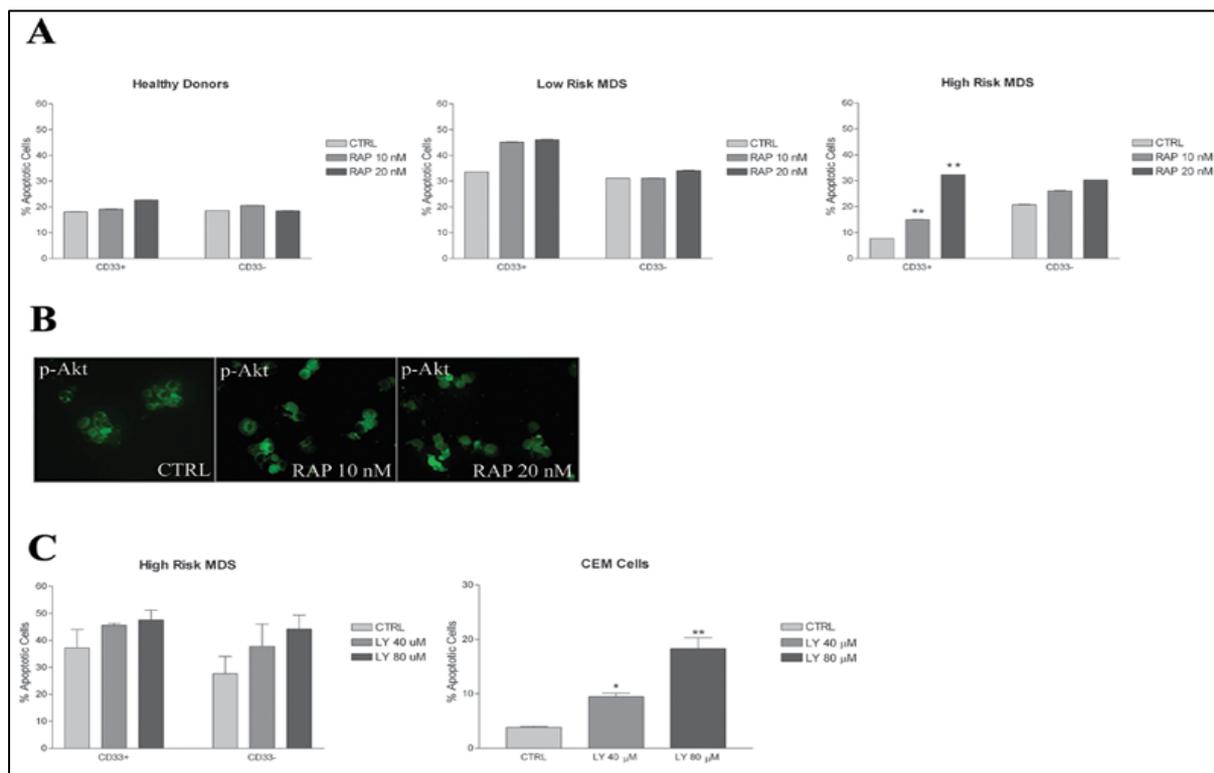


Figura 23. La rapamicina, ma non LY294002, aumenta in modo selettivo la percentuale di cellule apoptotiche nella frazione di cellule CD33+ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio. (A) Analisi al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche nelle cellule CD33+ e CD33- di donatori sani e pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio, in seguito a trattamento con dosi crescenti di rapamicina (0nM, 10nM, 20nM) per 48h. Non sono evidenziabili differenze statisticamente significative nella popolazione di cellule apoptotiche dei donatori sani né dei pazienti affetti da MDS a basso rischio. Al contrario, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano un aumento significativo delle cellule apoptotiche CD33+, mentre la frazione CD33- non presenta differenze sostanziali. Gli istogrammi rappresentano la media dei risultati di tre esperimenti indipendenti \pm SD. * $p < 0.05$ vs. CTRL; ** $p < 0.01$ vs. CTRL (Test di Dunnet dopo ANOVA). (B) Analisi immunocitochimica eseguita su cellule CD33+ dopo trattamento con rapamicina per 48h (Ingrandimento originale x600). Alle concentrazioni usate (0nM, 10nM, 20nM) non c'è aumento significativo di p-Akt, indicando che la rapamicina non attiva Akt tramite meccanismi di feedback. RAP: rapamicina. (C) Analisi al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche nelle cellule CD33+ e CD33- di pazienti affetti da MDS ad alto rischio e cellule CEM, in seguito a trattamento con dosi crescenti di LY294002 (0 μ M, 40 μ M, 80 μ M) per 24h. Non sono evidenziabili differenze statisticamente significative nella popolazione di cellule apoptotiche dei pazienti affetti da MDS ad alto rischio, sia nella frazione CD33+ che CD33-, mentre le cellule CEM sono sensibili a tale trattamento. Gli istogrammi rappresentano la media dei risultati di tre esperimenti indipendenti \pm SD. * $p < 0.05$ vs. CTRL; ** $p < 0.01$ vs. CTRL (Test di Dunnet dopo ANOVA).

6. Saggio Clonogenico su cellule CD34⁺ derivanti da donatori sani e pazienti affetti da MDS

In questo studio è stato anche analizzato l'effetto della rapamicina e di LY294002 sulla capacità clonogenica delle cellule CD34⁺ dei pazienti affetti da MDS. Le cellule CD34⁺, estratte da campioni di sangue midollare di donatori sani e pazienti affetti da MDS, sono state piastrate in un terreno di metilcellulosa in presenza di concentrazioni crescenti di rapamicina o LY294002. Le colonie e i cluster sono stati contati dopo 14 giorni di coltura (Figura 24). Secondo quanto osservato da Nissen-Druey (Nissen-Druey et al., 2005), le cellule CD34⁺ dei pazienti affetti da MDS davano origine a poche, piccole colonie, caratterizzate da aggregati di macrofagi ed eosinofili. Al contrario, le cellule CD34⁺ derivanti da donatori sani mostravano un normale processo differenziativo, in tutti i *lineage* emopoietici (eritroide, linfoide, mieloide). La rapamicina non aveva effetti sulla capacità clonogenica delle cellule CD34⁺ dei donatori sani. Per quanto riguarda i pazienti affetti da MDS a basso rischio, essi mostravano una lieve diminuzione, seppur non significativa, della crescita delle colonie dopo trattamento, rispetto a quanto osservato nei donatori sani (Figura 25A-B). Al contrario, il numero e la grandezza delle colonie derivanti dalle cellule CD34⁺ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio erano significativamente inferiori dopo trattamento, per cui la rapamicina mostra un effetto di inibizione della crescita delle colonie in modo dose-dipendente (Figura 25C). Per quanto riguarda LY294002, tale sostanza non riduce in modo sostanziale la crescita delle colonie nei pazienti affetti da MDS (Figura 25D).

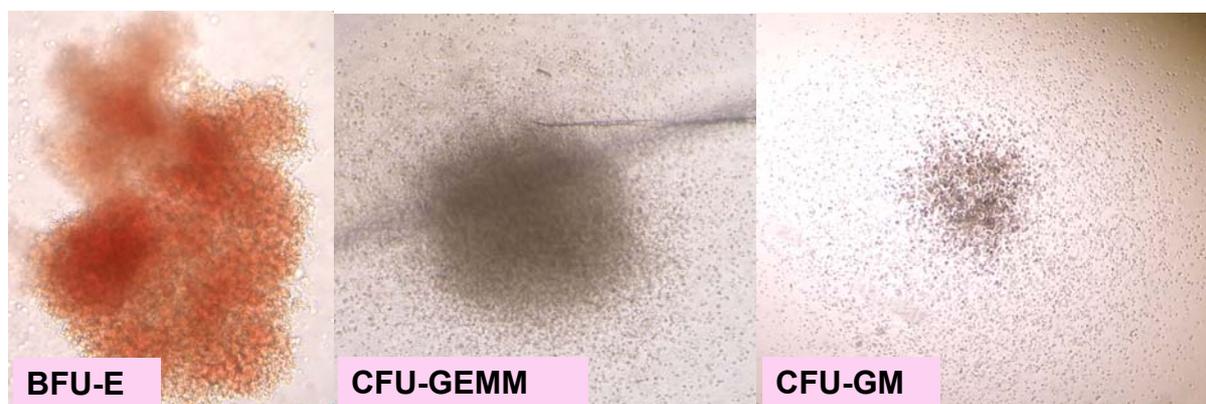


Figura 24. Saggio clonogenico in pazienti affetti da MDS. Immagine rappresentativa di alcune colonie appartenenti a diversi lineage emopoietici cresciuti dopo incubazione in metilcellulosa.

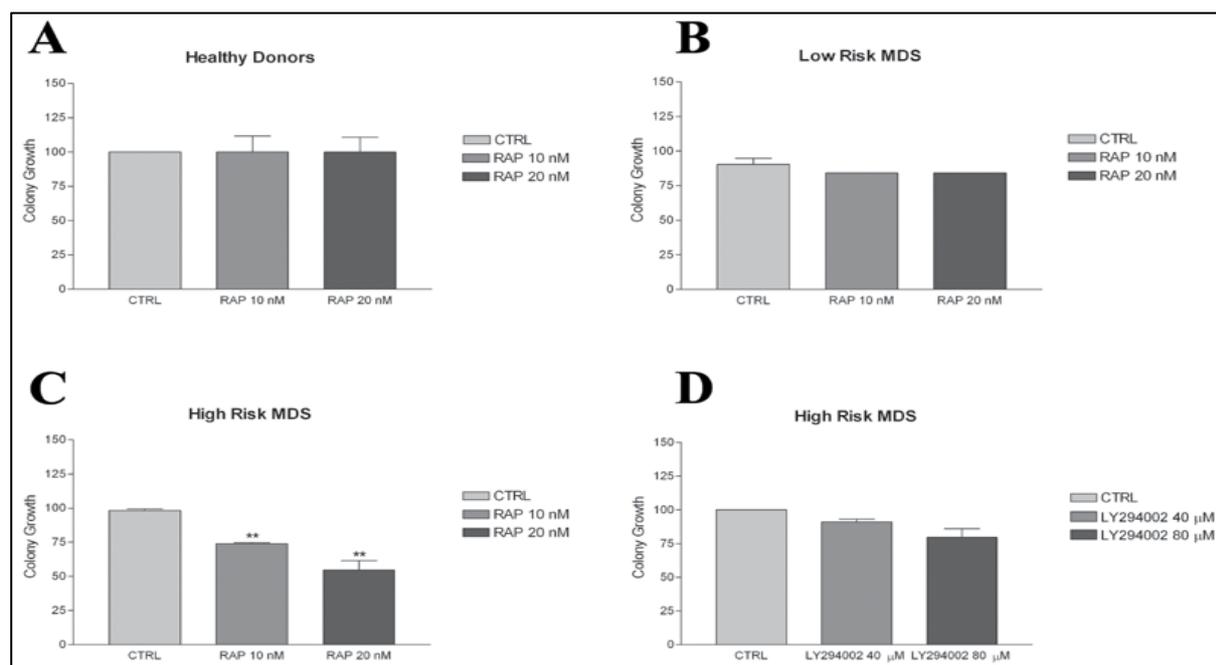


Figura 25. La rapamicina, ma non LY294002, inibisce la capacità clonogenica delle cellule CD34+ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio. Le cellule CD34+ estratte da donatori sani e pazienti affetti da MDS sono state incubate in presenza di concentrazioni crescenti di rapamicina o LY294002. Le colonie (>50cellule) o i cluster (<50cellule) sono state valutate dopo 14 giorni di coltura. (A) Donatori sani: la rapamicina non ha effetti sulla crescita delle colonie; (B) pazienti affetti da MDS a basso rischio: la rapamicina induce una lieve diminuzione del numero e della grandezza delle colonie, che non è statisticamente significativa; (C) pazienti affetti da MDS ad alto rischio: la rapamicina riduce significativamente il numero e la grandezza delle colonie. RAP: rapamicina. (D) Pazienti affetti da MDS ad alto rischio: LY294002 riduce leggermente, ma non significativamente, il numero e la grandezza delle colonie. I risultati sono espressi come percentuale rispetto al controllo e rappresentano la media dei risultati di tre esperimenti indipendenti \pm SD. * $p < 0.05$ vs. CTRL; ** $p < 0.01$ vs. CTRL (Test di Dunnett dopo ANOVA).

7. Studio del Fenotipo di Akt nelle MDS mediante Analisi al Citofluorimetro in un paziente affetto da MDS in seguito a trattamento con Azacitidina

Dal momento che lavorando con campioni biologici di pazienti non è possibile avere a disposizione abbastanza cellule per poter applicare metodiche di analisi proteica quali il Western Blotting, si è pensato di utilizzare un metodo di analisi al citofluorimetro per la rilevazione di p-Akt. Infatti, l'analisi dell'espressione di p-Akt è stata effettuata tramite l'uso di un anticorpo diretto contro il residuo Ser473 di p-Akt e coniugato in modo diretto con il fluorocromo FITC, che emette nel verde. In questo modo, è stato possibile analizzare il fenotipo delle cellule mononucleate dei pazienti affetti da MDS. La linea cellulare Jurkat, che esprime in modo costitutivamente alto p-Akt, in quanto presenta una delezione completa di PTEN, e la linea cellulare HL60, che ha invece una

bassa espressione di p-Akt, sono state utilizzate come controllo per questo tipo di esperimento. Per quanto riguarda i pazienti affetti da MDS, l'analisi è stata condotta su un paziente affetto da MDS ad alto rischio e sottoposto a trattamento con Azacitidina.

Come mostrato in Figura 26, le cellule Jurkat e HL60 rappresentano rispettivamente il controllo positivo e negativo per questa analisi. Il paziente mostra un'alta espressione di p-Akt alla diagnosi, mentre il trattamento con Azacitidina induce una progressiva diminuzione della proteina fosforilata, indicando quindi un calo nell'attivazione dell'asse PI3K/Akt.

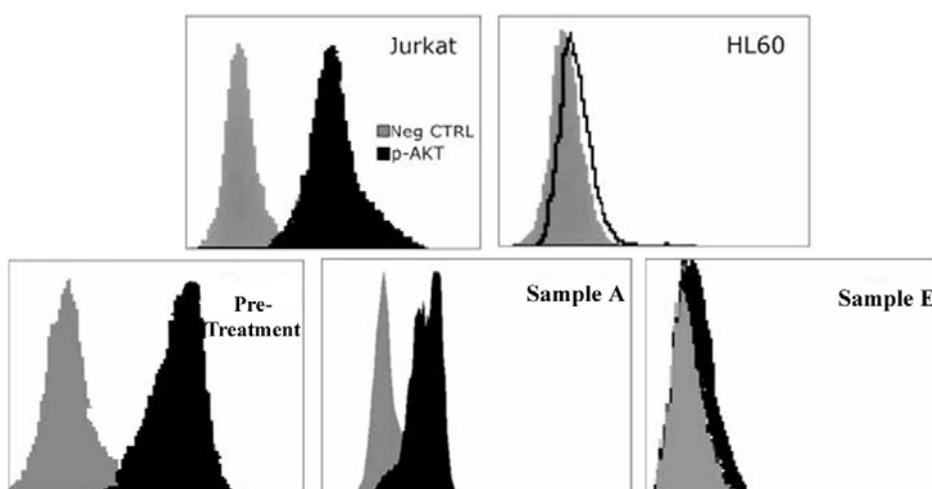


Figura 26. Analisi del fenotipo di Akt in un paziente affetto da MDS e trattato con Azacitidina. Le cellule Jurkat e HL60 rappresentano il controllo positivo e negativo per questo tipo di analisi. Il paziente alla diagnosi mostra un'alta espressione di p-Akt, che diminuisce progressivamente in seguito al trattamento con Azacitidina fino a diventare negativo.

8. Espressione genica delle forme trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b in un paziente affetto da MDS ad alto rischio in seguito a trattamento con Azacitidina

E' stata eseguita una quantificazione dei trascritti delle forme trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b in seguito a questo trattamento. In particolare, l'analisi è stata condotta su un paziente particolarmente responsivo alla suddetta terapia, di cui si avevano a disposizione prelievi successivi corrispondenti ai diversi cicli di trattamento. Il suddetto paziente è stato sottoposto a cicli successivi di terapia con Azacitidina, raggiungendo uno stato di remissione parziale secondo le linee guida dettate dall'International Working Group (IWG); in seguito, i valori ematologici del paziente hanno infatti indicato la presenza di una condizione di miglioramento ematologico, con una maggiore risposta eritroide e piastrinica.

Dal momento che il farmaco ha bisogno di tempo per poter essere completamente efficace, i valori dell'emoglobina riportati si riferiscono ai prelievi effettuati alla fine di ogni ciclo di trattamento, quando il farmaco dovrebbe aver raggiunto il picco massimo di efficacia.

Come mostrato in Figura 27, il paziente prima del trattamento presenta una minore espressione sia della PI-PLC β 1a che della PI-PLC β 1b, rispetto ai donatori sani. In Figura 28 e 29, invece, sono rappresentati i livelli di emoglobina e piastrine del paziente, che servono ad indicare lo stato clinico del soggetto: in particolare, il paziente è considerato in una condizione clinica migliore qualora i livelli di emoglobina siano intorno a 11 g/dL e le piastrine superiori a 100.000, mentre è considerato in uno stato clinico peggiore quando tali livelli si abbassano.

E' interessante notare che durante la somministrazione di Azacitidina il paziente ha mostrato un aumento dei livelli di mRNA di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLC β 1. Inoltre, è da sottolineare che l'evoluzione clinica del paziente presenta un andamento simile a quanto osservato per i livelli di PI-PLC β 1: quando il paziente si trova in condizioni cliniche migliori (Prelievi A-E), valutate grazie ai livelli di emoglobina e piastrine, anche la PI-PLC β 1 mostra valori superiori rispetto ai donatori sani, indicando un'induzione dell'espressione genica; d'altro canto, quando il paziente è entrato in uno stato clinico peggiore (Prelievi F-K), in cui i livelli di emoglobina e piastrine iniziano ad abbassarsi, anche i livelli di PI-PLC β 1 hanno iniziato a diminuire. Tuttavia, anche se l'analisi è stata condotta su entrambe le forme trascrizionali della PI-PLC β 1, i dati ottenuti indicano una maggior correlazione tra il grado di metilazione e l'espressione dell'isoforma 1b della PI-PLC β 1.

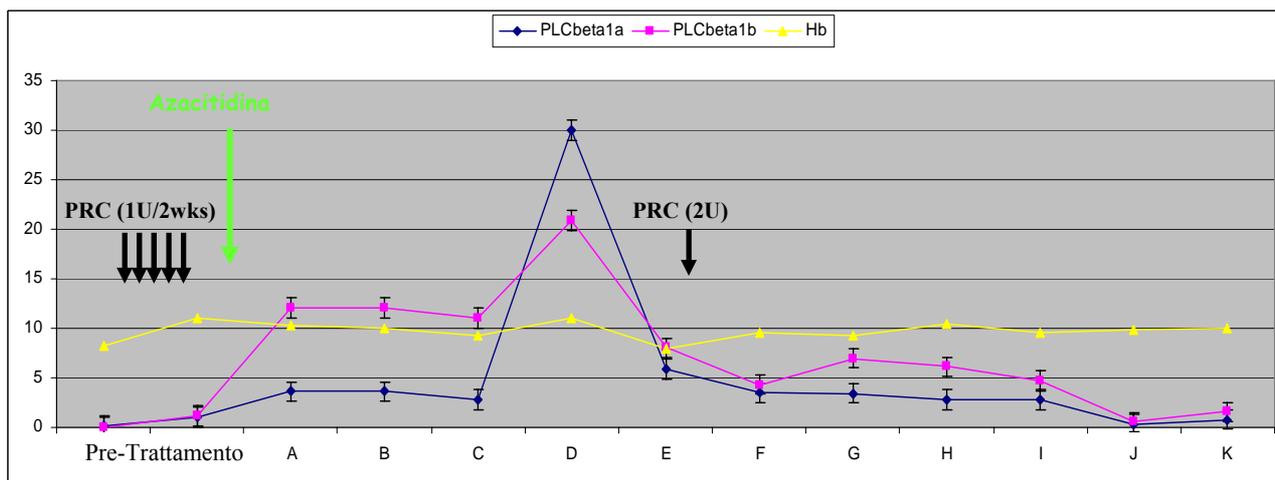


Figura 27. Quantificazione dei trascritti della PI-PLCβ1 in un paziente affetto da MDS e sottoposto a terapia con Azacitidina. Alla diagnosi, il paziente mostra livelli di PI-PLCβ1 inferiori rispetto ai donatori sani. Durante il trattamento con Azacitidina (Prelievi A-K), si nota un'induzione dell'espressione genica di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLCβ1, con quantità relative maggiori rispetto ai donatori sani. In particolare, l'aumento è crescente durante il periodo di risposta maggiore al farmaco (Prelievi A-E), mentre si ha una diminuzione durante il periodo successivo (Prelievi F-K), in cui il paziente si trova in uno stato clinico peggiore.

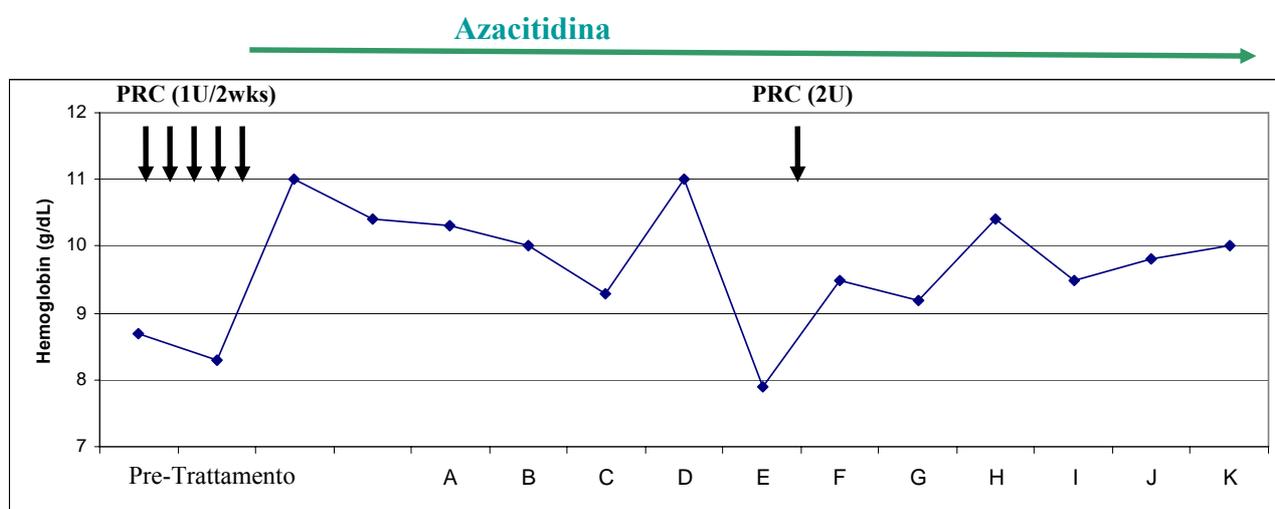


Figura 28. Quantificazione dei livelli di emoglobina in un paziente affetto da MDS e sottoposto a terapia con Azacitidina. Alla diagnosi, il paziente mostra bassi livelli di emoglobina. Durante il trattamento con Azacitidina (Prelievi A-K), si nota un aumento dei livelli di emoglobina. In particolare, l'aumento è crescente durante il periodo di risposta maggiore al farmaco (Prelievi A-E), mentre si ha una diminuzione durante il periodo successivo (Prelievi F-K), in cui il paziente si trova in uno stato clinico peggiore.

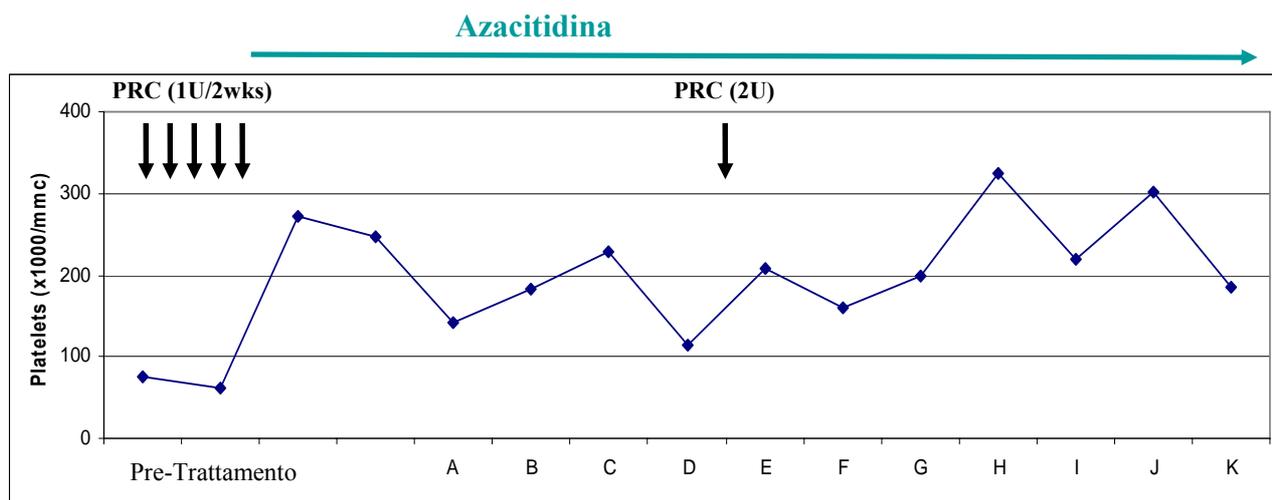


Figura 29. Quantificazione dei livelli di piastrine in un paziente affetto da MDS e sottoposto a terapia con Azacitidina. Alla diagnosi, il paziente mostra bassi livelli di piastrine. Durante il trattamento con Azacitidina (Prelievi A-K), si nota un aumento dei livelli di piastrine. In particolare, l'aumento è crescente durante il periodo di risposta maggiore al farmaco (Prelievi A-E), mentre al prelievo F i livelli sono scesi intorno a 100.000, per cui è stata necessaria una trasfusione (PRC-2U), nel complesso in quest'ultimo periodo (Prelievi F-K) il paziente si trova in uno stato clinico peggiore.

9. Studio dell'Espressione Proteica di Akt e PI-PLC β 1, mediante Analisi Immunocitochimica, in un paziente affetto da MDS in seguito a trattamento con Azacitidina

Dato che il trattamento con Azacitidina ha dimostrato avere un effetto sull'espressione genica sia della PI-PLC β 1a che della PI-PLC β 1b e sul fenotipo di p-Akt, è stata effettuata anche un'indagine immunocitochimica sulle cellule mononucleate del paziente già analizzato tramite Real-Time PCR e citofluorimetria e sottoposto a questo tipo di trattamento.

L'analisi è stata condotta per quantificare i livelli proteici di p-Akt e della PI-PLC β 1. Come mostrato in figura 25, la somministrazione di Azacitidina ha indotto un aumento di espressione della PI-PLC β 1, come già ipotizzato dall'aumento del corrispondente mRNA. In particolare, come già evidenziato dal livello di mRNA, c'è un progressivo aumento di PI-PLC β 1 (Prelievi A-D) fino ad un picco massimo di espressione (Prelievo E), relativo ad un periodo in cui il paziente era stato considerato in remissione completa, dopodichè la quantità di proteina inizia a diminuire (Prelievi F-K), in corrispondenza di un periodo in cui il paziente è stato considerato in remissione parziale.

Successivamente, è stata analizzata anche la quantità di p-Akt. La Figura 29 mostra che i livelli di p-Akt hanno un comportamento opposto rispetto a quanto osservato per la PI-PLC β 1. Infatti, alla diagnosi si ha un'alta espressione della proteina esaminata, mentre nel primo periodo di trattamento (Prelievi A-D) si ha una diminuzione dei livelli proteici, con un picco negativo (Prelievo E), prima di un lieve aumento dei valori proteici nel periodo successivo (Prelievi F-K).

Infine, sono stati valutati anche i livelli di PIP₂, substrato della PI-PLCβ1 e intermediario tra le due vie di traduzione del segnale, in quanto, come già descritto in precedenza, il PIP₂ viene trasformato in PIP₃, il quale interagisce con Akt per la sua attivazione e trasformazione in p-Akt. Come mostrato in Figura 30 e 31, i livelli di PIP₂ correlano con quanto osservato per la PI-PLCβ1, in quanto PIP₂ mostra delle fluttuazioni che seguono i livelli di PI-PLCβ1 e p-Akt durante il trattamento. In particolare, la Figura 30 è una rappresentazione schematica delle quantità delle tre proteine esaminate, valutando le intensità secondo una scala arbitraria che assegna il valore 0 al controllo negativo e 5 al controllo positivo, rappresentati rispettivamente dalle cellule HL60 e CEM analizzate per p-Akt. Nella Tabella sono rappresentati i valori relativi ai prelievi del paziente durante il trattamento, mentre nel grafico è rappresentato l'andamento complessivo delle tre proteine esaminate.

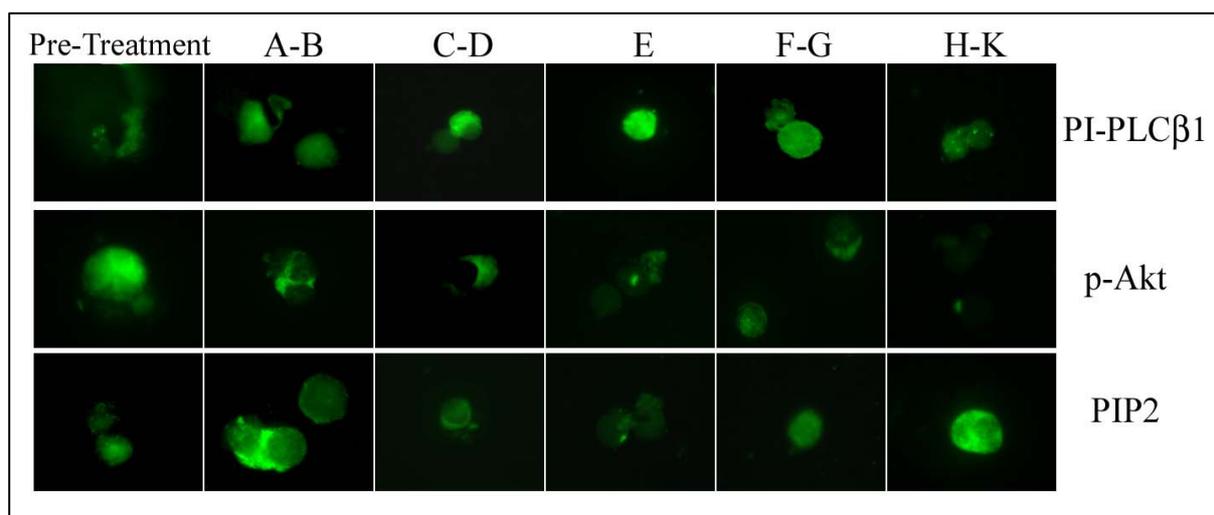


Figura 30. Analisi Immunocitochimica durante la somministrazione di Azacitidina. Alla diagnosi, l'intensità di p-Akt è massima, mentre è minima quella della PI-PLCβ1. Durante la prima parte del trattamento (Prelievi A-D), i livelli di PI-PLCβ1 aumentano, mentre diminuiscono quelli di p-Akt. In seguito si ha un picco massimo di espressione per la PI-PLCβ1 (Prelievo E), in corrispondenza di una quantità molto scarsa di p-Akt. Infine, durante l'ultima parte di terapia (Prelievi F-K), durante i quali il paziente è considerato in remissione parziale, i livelli sia della PI-PLCβ1 che di p-Akt tendono a stabilizzarsi, con la PI-PLCβ1 che mostra un'espressione maggiore rispetto a p-Akt.

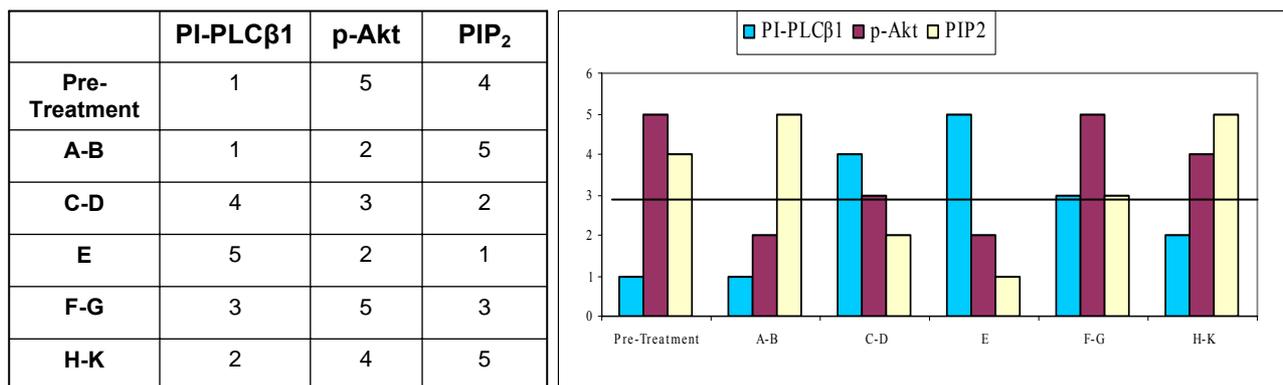


Figura 31. Quantificazione di PI-PLC β 1, p-Akt e PIP₂ durante il trattamento con Azacitidina. Nella tabella sono rappresentati i valori arbitrari assegnati alle diverse intensità delle tre proteine esaminate, secondo una scala in cui il valore 0 corrisponde al controllo negativo (quantità di p-Akt nelle cellule HL60) e 5 al controllo positivo (quantità di p-Akt nelle cellule CEM). Nel grafico sono rappresentate, invece, le fluttuazioni delle tre proteine durante le diverse fasi del trattamento e della risposta clinica del paziente.

10. Caratteristiche dei pazienti dello studio sulla metilazione

In questo studio sono state utilizzate cellule mononucleate estratte da campioni di sangue periferico e midollare di 15 pazienti affetti da MDS. In particolare, le caratteristiche di ogni paziente sono riassunte nelle Tabella 5. L'età media è 70.5 (range, 50-84 anni). I pazienti sono stati classificati secondo il fattore IPSS, considerando a basso rischio (n=3) coloro che rientrano nelle categorie Low o Intermediate-1 e ad alto rischio coloro che sono Intermediate-2 o High (n=12).

Tabella 7. Caratteristiche dei pazienti

Pazienti	Diagnosi			Data Screening	Età	Cariotipo	Trattamento	PLCβ1	Evoluzione AML	Sopravvivenza
	FAB	WHO	IPSS							
RE	AREB	AREB 2	INT 2	MAR '06	84	tri 8	AZA	+/+		62 +
SV	AREB	AREB 2	INT 2	AGO '04	60	46 XY	AZA (+ EPO)	+/+		19 +
BAM	AREB	AREB 2	HIGH	GIU '06	80	COMPLEX	AZA	+/-	19 m	34 -
CM	AREB	AREB 2	HIGH	GEN '05	62	COMPLEX	AZA	+/+		
RG	AREB	AREB 2	INT 2	FEB '02	62	46 XY	AZA	+/+	7 m	14 -
GMI	AREB	AREB 2	INT 2	GIU '04	63	t (2;3)	AZA	+/-		31 -
NE	AREB	AREB 2	INT 2	GIU '06	79	46 XY	AZA	+/-		62 +
RGP	AREB	AREB 2	HIGH	MAR '05	68	tri 8	AZA	+/-	12 m	18 -
MO	AREB	AREB 2	INT 2	GEN '07	80	tri 8	AZA (VPA)	+/+	30 m	31 -
GM	AR	RCMD	INT 2	SETT '04	50	-7	AZA (VPA, ATRA)	+/-	10 m	43 -
MA	AREB T	AREB 2	INT 2	NOV '05	78	46 XY	AZA (VPA, ATRA)	+/+		61 -
PR	AREB	AREB 1	INT 2	OTT '05	78	tri 21	AZA (VPA, ATRA)	+/+	28 m	33 -
LLG	AREB	AREB 1	INT 1	NOV '07	56	46XY	AZA	+/-		6 +
RD	AR	MDS	LOW	AGO '07	76	46XY	AZA	+/+		9 +
MOO	AR	AR	INT 1	OTT '07	82	t(12;15)	Supporto	+/+		7 +

11. Presenza di isole CpG nel promotore putativo del gene della PI-PLCβ1

Attraverso analisi effettuate con il software Methyl Primer Express v1.0 della sequenza genomica del gene della PI-PLCβ1 (GenBank Accession Number: AL-050323), dall'inizio fino all'ATG del gene (33.301 bp) sono state individuate due regioni con una concentrazione di nucleotidi CG maggiore del 50%, denominate rispettivamente isola 1 ed isola 2:

- isola CpG 1: da 15.001 bp a 19.981 bp
- isola CpG 2: da 30.961 bp a 33.301 bp



Figura 32: Localizzazione delle due isole CpG nella sequenza del promotore della PI-PLCβ1.

12. Livelli di metilazione delle isole CpG nel promotore del gene della PI-PLCβ1

La valutazione dello stato di metilazione delle isole CpG 1 e 2 è stato indagato in PCR e i prodotti sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% in etidio bromuro. I livelli di metilazione dell'isola 1 in pazienti affetti da MDS rispetto ai donatori sani (HD) non sono sensibilmente differenti e statisticamente significativi. Invece, i livelli di metilazione dell'isola 2 hanno mostrato differenze significative tra i pazienti affetti da MDS rispetto ai donatori sani (HD) come mostrato in Figura 33.

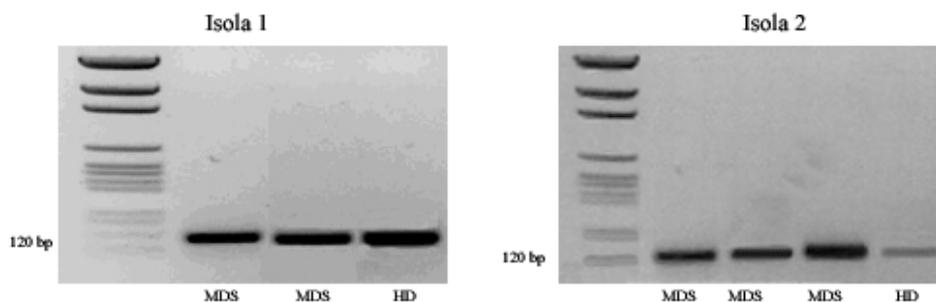


Figura 33. A sinistra livelli di metilazione dell'isola 1, a destra dell'isola 2, di campioni rappresentativi di pazienti affetti da MDS e di un campione rappresentativo di un pool di donatori sani (HD)

13. Stato della metilazione delle isole CpG nel promotore della PI-PLC β 1 nelle linee cellulari

Lo stato della metilazione dell'isola CpG 2 è stato analizzato nelle linee cellulari Jurkat, HL60, MDA-MB-453 e HeLa, mediante Real Time PCR Metilazione Specifica, per individuare la linea cellulare con un basso livello di metilazione, e quindi con un alto livello di trascrizione dell'isoforma PLC β 1b, e la linea cellulare con un alto livello di metilazione, e quindi con un basso livello di trascrizione dell'isoforma PLC β 1b, da utilizzare come linee di controllo nei trattamenti con l'azacitidina.

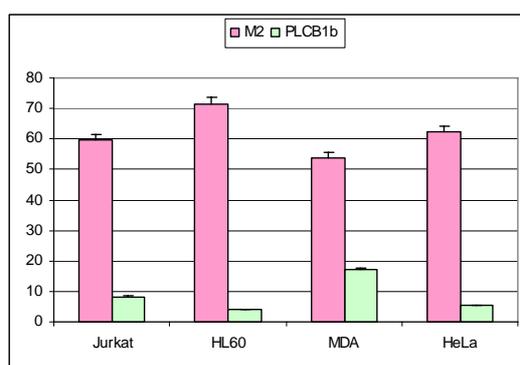


Figura 34. Livelli di metilazione dell'isola CpG 2 e di trascrizione dell'isoforma b della PI-PLC β 1 nelle linee cellulari

Le linee cellulari che hanno risposto alle nostre esigenze si sono dimostrate essere le HL60 e le MDA-MB-453 sulle quali si è quindi proceduto con ulteriori analisi. Le cellule Jurkat ed HeLa hanno alti livelli di metilazione e bassi livelli di trascrizione genica che comunque sono rispettivamente maggiori ed inferiori alle HL60.

14. Saggio di proliferazione cellulare per la determinazione della concentrazione non citotossica dell'Azacitidina nei trattamenti delle linee cellulari.

Attraverso un saggio di proliferazione cellulare le linee cellulari HL60 e MDA-MB sono state trattate con Azacitidina 1, 3, 5 μM per 24 h per valutare le dosi citotossiche.

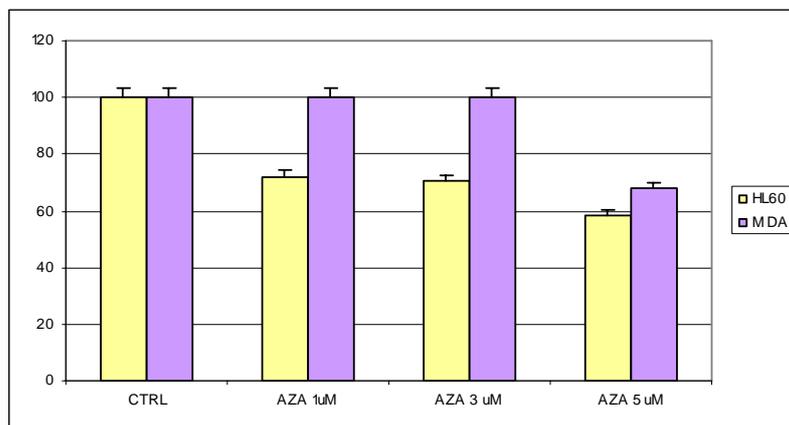


Figura 35: Trattamenti con azacitidina a diverse concentrazioni su HL60 e MDA-MB per 24 h

Come mostrato in Figura 35, la concentrazione che riduce significativamente l'attività di proliferazione cellulare nelle due linee trattate, senza però indurre una citotossicità superiore al 50%, si è dimostrata essere 5 μM .

15. Analisi della variazione dello stato di metilazione e dell'espressione genica della PI-PLC β 1 in seguito a trattamento con Azacitidina

Per valutare l'effetto demetilante dell'azacitidina, lo stato di metilazione dell'isola CpG 2 e il livello di trascrizione genica dell'isoforma PI-PLC β 1b nelle linee cellulari HL60 e MDA-MB-453 sono stati valutati rispettivamente con Real Time Metilazione Specifica in Sybr Green e Real Time con sonda TaqMan. Le cellule sono state trattate con Azacitidina 5 μM per 24 h in seguito ai dati ottenuti dal saggio di proliferazione cellulare.

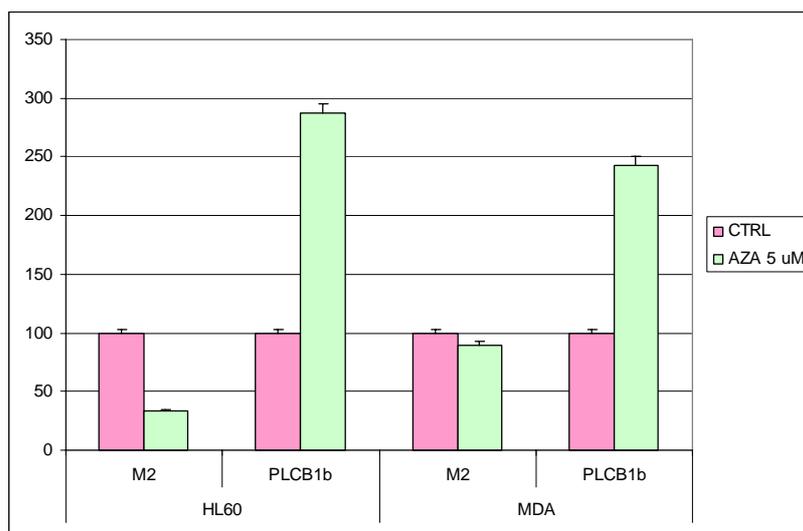


Figura 36. Lo stato della metilazione dell'isola CpG 2 e il livello di trascrizione genica della PI-PLC β 1b nei controlli e nei trattati con Azacitidina 5 μ M per 24 h delle linee cellulari HL60 e MDA-MB-453.

Le cellule HL60 hanno un livello di metilazione basale superiore rispetto alle cellule trattate con Azacitidina 5 μ M per 24 h, che induce una riduzione dei livelli di metilazione del 66%; la trascrizione invece aumenta del 187% in seguito a trattamento.

Le MDA-MB-453 hanno un livello di metilazione basale superiore rispetto al trattamento con Azacitidina 5 μ M per 24 h che induce una riduzione dei livelli di metilazione del 10%; la trascrizione invece aumenta del 143% in seguito a trattamento.

16. Saggio di attività della fosfatasi alcalina in seguito a clonaggio dell'isola CpG 2 nel vettore pSEAP2-Basic.

Ipotizzando che l'azacitidina possa interagire direttamente a livello dell'isola CpG 2 della PI-PLC β 1, questa regione è stata clonata all'interno del vettore pSEAP2-Basic. Il vettore plasmidico così ottenuto, sia wild-type che metilato in vitro, è stato trasfettato nelle cellule HL60. A 16 h dalla trasfezione l'attività della fosfatasi alcalina è risultata essere maggiore nei trasfettati con il vettore wild-type rispetto a quello metilato in vitro, così come mostrato in Figura 37.

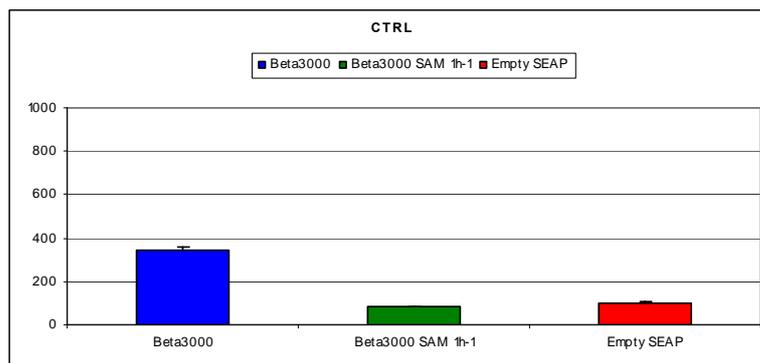


Figura 37. Attività della fosfatasi alcalina nelle HL60 transfettate con vettore plasmidico in cui è stata clonata la sequenza dell'isola CpG2 della PI-PLC β 1. In blu è rappresentata l'attività del vettore *wild-type*, in verde quella del vettore metilato *in vitro* e in rosso l'attività delle fosfatasi endogene del sistema cellulare utilizzato, già sottratte in analisi agli altri due dati.

Dopo trattamento con Azacitidina 5 μ M per 24 h, l'attività della fosfatasi alcalina, soprattutto nel campione con il vettore metilato *in vitro*, aumenta dell'82% rispetto al livello basale, come mostrato in Figura 38.

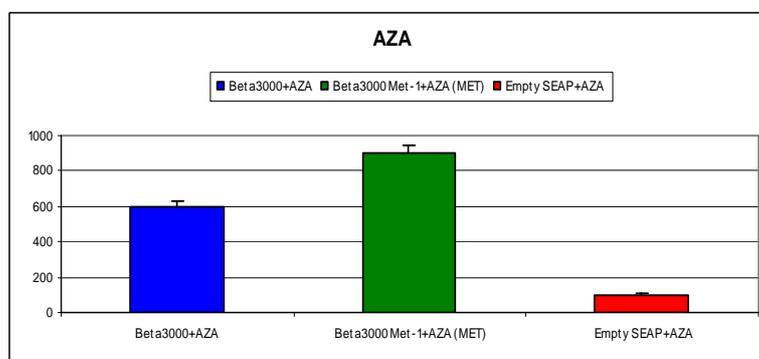


Figura 38. Attività della fosfatasi alcalina nelle HL60, trasfettate con vettore plasmidico in cui è stata clonata la sequenza dell'isola CpG2 della PI-PLC β 1, dopo trattamento con Azacitidina 5 μ M per 24 h. In blu è rappresentata l'attività del vettore *wild-type*, in verde quella del vettore metilato *in vitro* e in rosso l'attività delle fosfatasi endogene del sistema cellulare utilizzato, già sottratte in analisi agli altri due dati.

17. Valutazione dello stato di metilazione dell'isola 2 CpG e della trascrizione genica dell'isoforma b della PI-PLC β 1 nei pazienti affetti da MDS

Entrambe le analisi sono state condotte mediante metodiche di Real Time PCR con quantificazione attraverso il metodo del $\Delta\Delta$ Ct. Il gene housekeeping utilizzato per la normalizzazione dei dati è stato in entrambi i casi la GAPDH (Gliceraldeide 3-Fosfato Deidrogenasi) in quanto mostra la minima variazione dello stato di metilazione e quello di trascrizione tra controllo e trattati. Invece le differenze nello stato di metilazione e nei livelli di espressione genica sono state valutate paragonando i campioni dei pazienti con un pool di 10 donatori sani che provengono dall'Istituto di Ematologia ed Oncologia Medica "L. e A. Seràgnoli" dell'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna i quali hanno dato il loro consenso informato, come richiesto dalle linee guida internazionali.

Come dimostrato recentemente (Follo et al, 2008), è specialmente l'isoforma b della PI-PLC β 1, quella esclusivamente nucleare, che si modula in maggior misura nei pazienti affetti da MDS in trattamento con Azacitidina ed è questa isoforma che subisce una drastica riduzione nei pazienti con la delezione criptica mono-allelica del gene. E' per queste ragioni che le analisi effettuate hanno preso principalmente in considerazione le variazioni trascrizionali di tale isoforma.

Tabella 8. Stato della metilazione e andamento clinico dei pazienti

Pazienti	Metilazione	Outcome Clinico
RE	Diminuzione Metilazione	H.I.
SV	Diminuzione Metilazione, Ultimi Prelievi in Leggero Aumento	CR
BAM	Diminuzione Metilazione	HI, AML
CM	Diminuzione Metilazione, quindi Aumento	Major HI, AML, Death
RG	Metilazione in Aumento	Minor HI, Death
GMI	Metilazione in Aumento	Peggioramento, AML
NE	Metilazione in Aumento	Peggioramento, Death
RGP	Metilazione in Aumento - 2 Prelievi	Peggioramento, Death
MO	Metilazione in Aumento	Malattia Stabile, ma AZA+VPA+ATRA
GM	Metilazione in Aumento, Leggera Diminuzione, quindi Nuovo Aumento	Malattia Stabile, ma AZA+VPA+ATRA
MA	Pre-AZA: Metilazione Alta e in Aumento, poi AZA e Diminuzione Metilazione, quindi Nuovo Aumento	Malattia Stabile, ma AZA+VPA+ATRA
PR	Pre-AZA: Fluttuante, ma Metilazione in Aumento, quindi Inizio AZA, quindi Metilazione in Aumento	Malattia Stabile, ma AZA+VPA+ATRA
LLG	Pre-AZA: Fluttuante, in Aumento	AZA BS
RD	Pre-AZA: all'inizio Aumento, poi Calo	Non risposta a GRC, AZA BS
MOO	Metilazione in Aumento	

Nella Tabella 8 sono riportati i dati dello stato della metilazione di ogni paziente con il corrispettivo andamento clinico. Da notare che un aumento della metilazione corrisponde ad un peggioramento delle condizioni cliniche o ad una stabilizzazione delle stesse che richiede il supporto di altre terapie di supporto quali l'acido retinoico (ATRA) e l'acido valproico (VPA).

I 4 casi più rappresentativi della casistica sono riportati di seguito. Dal momento che il farmaco ha bisogno di tempo per poter essere completamente efficace, i valori della trascrizione genica riportati si riferiscono ai prelievi effettuati dopo un ciclo di trattamento rispetto alla somministrazione dell'Azacitidina, momento in cui invece viene valutato lo stato di metilazione dell'isola CpG 2. I dati sono stati analizzati dal punto di vista statistico mediante l'uso del software GraphPad Prism (Versione 3.0), dal quale è risultato che i campioni esaminati sono correlati in modo statisticamente significativo.

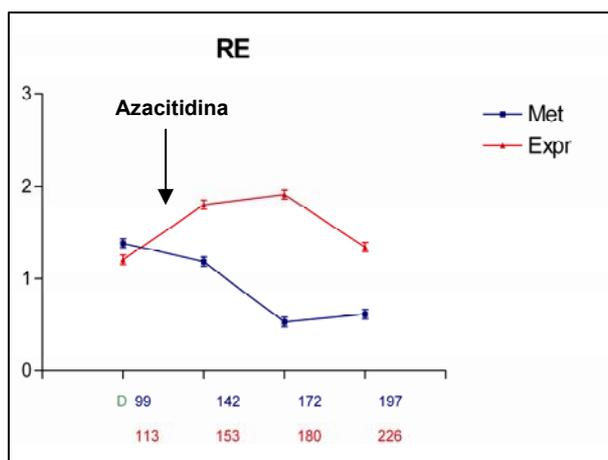


Figura 39. RE è un paziente senza delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1; ha mostrato una diminuzione dello stato di metilazione con corrispettivo incremento della trascrizione genica. Clinicamente il paziente ha avuto un miglioramento ematologico.

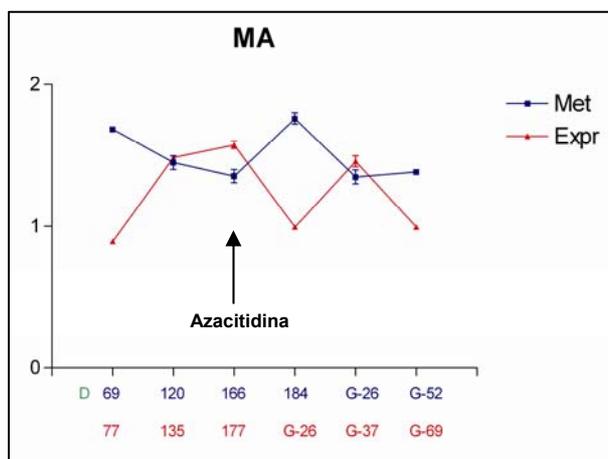


Figura 40. MA: è un paziente senza delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1; ha mostrato un aumento dello stato di metilazione con corrispettiva diminuzione della trascrizione genica prima del trattamento con Azacitidina. Dopo Azacitidina i livelli di metilazione sono prima diminuiti e poi riaumentati (parallelamente, ma in modo inverso, quelli della trascrizione genica). Clinicamente il paziente ha una malattia stabile ed è stato supportato con l'aggiunta di ATRA e VPA.

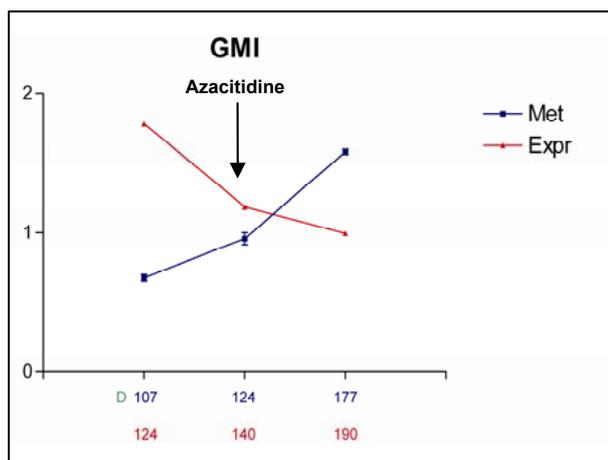


Figura 41. GMI: è un paziente con la delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1; ha mostrato un aumento dello stato di metilazione con corrispettiva diminuzione della trascrizione genica anche dopo trattamento con Azacitidina. Clinicamente il paziente è peggiorato ed è evoluto in AML.

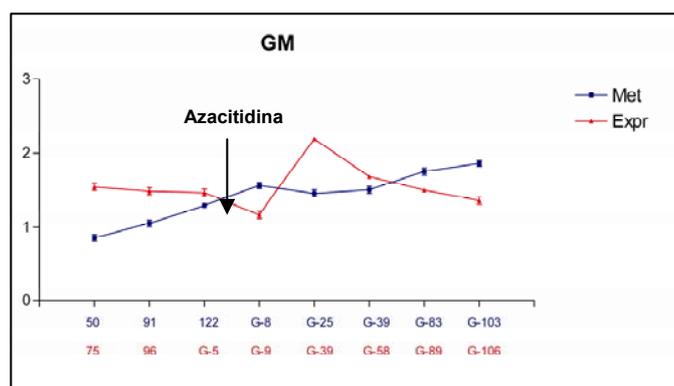


Figura 42. GM: è un paziente con la delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1; ha mostrato un aumento dello stato di metilazione prima del trattamento con Azacitidina in seguito al quale ha mostrato una diminuzione e di nuovo un aumento (parallelamente, ma inversamente, si è modulata la trascrizione genica). Clinicamente il paziente è stabile ed è stato supportato con l'aggiunta di ATRA e VPA .

DISCUSSIONE

Le vie di segnalazione lipidica intranucleare rivestono un ruolo sempre più importante nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare, che sono strettamente correlati alla trasformazione neoplastica. Da un lato, è stato dimostrato che la PI-PLC β 1 influenza la ciclina D3 ed agisce quindi sulla progressione lungo la fase G1 del ciclo cellulare. D'altro lato, l'attivazione dell'asse di segnalazione P3K/Akt è stata correlata ad un aumento della sopravvivenza cellulare.

Una via di segnalazione inositide-dipendente è quella dell'asse di attivazione PI3K/Akt. Tale via è coinvolta nella leucemogenesi (Samstag and Nebl, 2005), in quanto PI3K/Akt promuove la sopravvivenza dei blasti leucemici (Brandts et al., 2005; Grandage et al., 2005; Zeng et al., 2006). Inoltre, la quantificazione della fosforilazione di Akt (Min et al., 2003), dell'espressione della subunità p110 δ della PI3K (Sujobert et al., 2005) e l'analisi di mutazioni a carico del gene della subunità p110 α della PI3K (Bousquet et al., 2005; Liu and Roberts, 2006) sono considerati marcatori prognostici nello studio della progressione della leucemia mieloide acuta.

E' stato recentemente dimostrato che anche l'asse Akt/mTOR è frequentemente alterato in pazienti affetti da MDS ad alto rischio, facendo ipotizzare quindi un'alterazione dei meccanismi di proliferazione ed apoptosi cellulare che sono regolati dagli intermediari della suddetta via di sopravvivenza cellulare (Nyakern et al., 2006).

A partire da queste premesse, è stato esaminato lo stato funzionale di alcuni bersagli molecolari di Akt: mTOR, 4E-BP1 e p70S6K. Le analisi immunocitochimiche effettuate hanno dimostrato che tali proteine sono altamente fosforilate nelle cellule mononucleate di pazienti affetti da MDS, confrontando l'intensità del segnale dei soggetti con MDS con quello ottenuto dallo studio di campioni di cellule mononucleate estratte da donatori sani, che sono risultati negativi. In particolare, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano alti livelli sia di p-mTOR che dei bersagli a valle (p-4E-BP1 e p-p70S6K), mentre i pazienti affetti da MDS a basso rischio presentano, a parità di tempo di esposizione, una minore intensità del segnale (Follo et al., 2007).

Per studiare l'importanza rivestita dall'attivazione di mTOR e dei suoi bersagli a valle nella proliferazione e differenziamento delle cellule dei pazienti affetti da MDS, è stata usata la rapamicina, un macrolide che inibisce mTOR in modo specifico ed è attualmente usato da solo o in combinazione con la ciclosporina come farmaco immunosoppressivo (Giles and Albitar, 2005; Recher et al., 2005; Vignot et al., 2005). Inoltre, negli ultimi anni la rapamicina è stata impiegata in diversi trials clinici nel trattamento delle leucemie mieloidi acute ed altre neoplasie ematologiche (Platzbecker et al., 2005; Yee et al., 2006). L'azione inibitoria della rapamicina non è diretta, ma agisce tramite il legame con l'immunofilina (FK506 binding protein 12, FKBP12); una volta formato il complesso rapamicina/FKBP12, esso si lega ad mTOR per inibire le vie di segnalazione a valle.

L'effetto dell'attivazione dell'asse Akt/mTOR è stato studiato in cellule CD33⁺ e CD33⁻ isolate da campioni di donatori sani e pazienti affetti da MDS; in particolare, le cellule sono state trattate per 48h con concentrazioni crescenti di rapamicina e successivamente è stato analizzato il ciclo cellulare mediante analisi al citofluorimetro.

E' interessante notare non solo che il livello basale delle cellule apoptotiche (in fase sub-G1) nelle cellule CD33⁺ di donatori sani e pazienti affetti da MDS a basso rischio è più alto rispetto a quanto osservato nei campioni di pazienti affetti da MDS ad alto rischio; ma è anche importante sottolineare che i risultati ottenuti mostrano che tale percentuale non è modificata in modo significativo dal trattamento con rapamicina. Questi dati sono in accordo con il fatto che nei donatori sani la via di sopravvivenza Akt/mTOR non è attiva. Per quanto riguarda i pazienti affetti da MDS, l'alta percentuale dell'apoptosi basale nei pazienti a basso rischio consolida le osservazioni cliniche che indicano la presenza in tali soggetti di un'attivazione dei meccanismi di morte cellulare ed una bassa proliferazione dei blasti tumorali. Invece, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano una bassa percentuale di cellule apoptotiche in condizioni basali, facendo supporre che in tali soggetti la via di sopravvivenza Akt/mTOR sia attiva. Ciò è stato successivamente confermato dal fatto che il trattamento con rapamicina ha indotto un incremento della frazione di cellule in fase sub-G1.

E' da sottolineare il fatto che in tutti i casi analizzati, sia nei donatori sani che nei pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio, il ciclo cellulare della frazione CD33⁻ non subisce variazioni significative in seguito al trattamento con rapamicina, indicando quindi che la via Akt/mTOR è specificamente attiva nel *lineage* mieloide. Infatti, le cellule risultate positive per il marker CD71, caratteristico del *lineage* eritroide, non mostrano fosforilazione nelle proteine della via Akt/mTOR. Inoltre, tali dati potrebbero spiegare perché l'evoluzione delle MDS in eritroleucemia è un fatto poco frequente (Kowal-Vern et al., 2000).

Poiché la via di attivazione Akt/mTOR influenza i meccanismi di differenziamento cellulare, è stato valutato l'effetto della rapamicina su cellule CD34⁺ estratte da donatori sani e pazienti affetti da MDS, mediante saggi per valutare la capacità clonogenica di tali cellule. I dati ottenuti dai suddetti esperimenti mostrano che il farmaco esaminato inibisce, significativamente e in modo dose-dipendente, il numero e la grandezza delle colonie derivanti da cellule CD34⁺ estratte da pazienti affetti da MDS ad alto rischio. Al contrario, né i donatori sani né i casi di MDS a basso rischio hanno mostrato alterazioni significative nel numero e grandezza delle colonie cresciute in metilcellulosa dopo trattamento con rapamicina.

Recentemente, alcuni studi hanno osservato che la rapamicina potrebbe attivare Akt attraverso un meccanismo di *feedback* negativo, ma le condizioni sperimentali descritte in questo studio non

hanno mostrato ulteriore attivazione di Akt. Inoltre, esperimenti di immunocitochimica, condotti su cellule di pazienti affetti da MDS per verificare l'espressione di Erk1/2, hanno evidenziato che tale proteina è fosforilata, e quindi attivata, in donatori sani e pazienti affetti da MDS a basso rischio, ma non nei casi ad alto rischio. Tale fenomeno distingue le MDS dalle AML, dove è attivo sia Akt che Erk1/2 (Ricciardi et al., 2005).

Inoltre, considerando il fatto che LY294002, inibitore di PI3K, non abbia mostrato effetti né sul ciclo cellulare né sulla capacità clonogenica di cellule CD33⁺ e CD34⁺ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio, è verosimile ipotizzare che in questi casi l'attivazione della via Akt/mTOR sia PI3K-indipendente. Tale supposizione è rafforzata anche dall'osservazione che nessuno dei casi analizzati presenta mutazioni a carico del gene che codifica per la subunità p110 α della PI3K. Per di più, risultati preliminari mostrano che l'uso di un inibitore selettivo per la PI3K δ (Billottet et al., 2006), che si è visto essere particolarmente efficace in pazienti affetti da AML per inibire la proliferazione cellulare, non ha effetto sui casi MDS ad alto rischio analizzati. Si tratta quindi di un'ulteriore distinzione tra MDS e AML, anche se sono noti rari casi di AML in cui l'attivazione di Akt indipendente da PI3K (Martelli AM et al, 2006). Alcune ipotesi sono legate al fatto che la PKC β rappresenta una via alternativa per la regolazione di Akt in alcuni casi di leucemia linfocitica cronica (Barragan et al., 2006) e mieloma multiplo (Rizvi et al., 2006). Diversamente, l'attivazione di Akt vista nelle MDS potrebbe essere legata alla diminuzione dell'attività di alcune fosfatasi (Martelli et al., 2005b).

I risultati ottenuti dall'analisi dell'asse di segnalazione Akt/mTOR potrebbero spiegare lo sbilanciamento tra proliferazione ed apoptosi osservato nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio. E' verosimile quindi ipotizzare anche per Akt e mTOR un ruolo nella patogenesi delle MDS. In particolare, non solo la rapamicina mostrato un effetto inibitorio sulla via Akt/mTOR in vitro, ma è anche stata recentemente testata in uno studio pilota su casi affetti da MDS (Yee et al., 2006).

Recentemente, è stato dimostrato che le vie di segnalazione fosfoinositide-dipendente possono essere coinvolte nella progressione delle sindromi mielodisplastiche (MDS) in leucemia mieloide acuta (AML). E' stato infatti dimostrato che la presenza di una delezione monoallelica a carico del gene della PI-PLC β 1 è correlata in modo statisticamente significativo ad una peggiore prognosi rispetto a pazienti con entrambe le copie del gene, in quanto i pazienti che mostrano la delezione hanno avuto un decorso clinico peggiore (Follo, 2008; Lo Vasco et al., 2004; Lo Vasco et al., 2006).

Inoltre, avendo dimostrato che la delezione è correlata anche ad una robusta riduzione della PI-PLC β 1b, localizzata completamente nel nucleo e coinvolta nella progressione fisiologica dalla fase

G1 del ciclo cellulare, si potrebbe ipotizzare per la PI-PLC β 1 un ruolo nelle alterazioni del ciclo cellulare dei pazienti affetti da MDS (Follo, 2008).

L'azacitidina è un farmaco ad azione demetilante (inibisce le DNA metiltransferasi) utilizzato attualmente nel trattamento dei pazienti affetti da MDS ad alto rischio di evoluzione in AML e recentemente inserito in protocolli sperimentali che riguardano pazienti affetti da MDS a basso rischio di evoluzione in AML per valutare l'effetto del farmaco nella prevenzione della progressione da MDS a AML. Tuttavia, sebbene il farmaco sia correntemente utilizzato, non sono ancora del tutto chiariti i meccanismi molecolari alla base dell'effetto di tale molecola. Per questo motivo è di grande interesse identificare nuovi bersagli molecolari che possano spiegare il meccanismo d'azione dell'Azacitidina. In particolare, il nostro gruppo di ricerca ha condotto uno studio su un paziente particolarmente responsivo sottoposto a trattamento con Azacitidina, nel quale è stato indagato l'andamento dell'espressione genica delle due isoforme della PI-PLC β 1, l'isoforma a, con localizzazione sia citoplasmatica che nucleare, e l'isoforma b con localizzazione esclusivamente nucleare. E' interessante notare che durante la somministrazione del farmaco il paziente ha mostrato un aumento dei livelli di mRNA di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLC β 1 (Follo et al., 2008). Inoltre, è da sottolineare che l'evoluzione clinica del paziente ha presentato un andamento simile a quanto osservato per i livelli di PI-PLC β 1: quando il paziente si trovava in condizioni cliniche migliori, valutate grazie ai livelli di emoglobina e piastrine, anche la PI-PLC β 1 mostrava valori superiori rispetto ai donatori sani, indicando un'induzione dell'espressione genica; d'altro canto, quando il paziente è entrato in uno stato clinico peggiore, in cui i livelli di emoglobina e piastrine hanno iniziato ad abbassarsi, anche i livelli di PI-PLC β 1 sono diminuiti. Da questi risultati abbiamo ipotizzato che l'Azacitidina potesse agire direttamente a livello del promotore della PI-PLC β 1, per cui è stata verificata la presenza di eventuali isole CpG a livello del promotore del gene. In particolare, sono state identificate 2 isole CpG, una più a valle e una più a monte dell'ATG del gene: ulteriori analisi, effettuate mediante PCR, hanno mostrato che i livelli di metilazione dell'isola 1 del promotore della PI-PLC β 1 non variano tra un pool di donatori sani e pazienti affetti da MDS. Invece, per quanto riguarda l'isola 2, i risultati ottenuti indicano un grado di metilazione più alto nei pazienti con MDS rispetto al pool di donatori sani, facendo quindi ipotizzare che questa regione possa rappresentare un bersaglio specifico per la terapia demetilante. Le analisi si sono quindi focalizzate sull'isola 2, analizzando dapprima diverse le linee cellulari al fine di trovare quelle che potessero rappresentare il controllo positivo (HL60) e quello negativo (MDA-MB-453) della metilazione. Successivamente, su queste linee è stato testato l'effetto dell'Azacitidina, mediante saggi di proliferazione cellulare in condizioni basali e in seguito a somministrazione di dosi crescenti di azacitidina per 24h (1-3-5 μ M), scegliendo trattamenti a

5 μM , che avevano un effetto demetilante con una citotossicità non superiore al 50%. In seguito, dall'analisi dello stato di metilazione dell'isola 2 CpG e dello stato di trascrizione genica delle forme trascrizionali della PI-PLC β 1, si è evinto che lo stato basale sia di metilazione che di trascrizione viene modificato in seguito a trattamento con Azacitidina e che è l'isoforma PI-PLC β 1b ad essere prevalentemente modulata durante il trattamento con le terapie demetilanti.

Per verificare che l'effetto dell'Azacitina fosse diretto effettivamente sull'isola CpG 2, la sequenza corrispondente all'isola è stata clonata in un vettore contenente la fosfatasi alcalina come gene reporter. In condizioni basali, l'attività del vettore contenente la sequenza dell'isola 2 *wild-type* ha mostrato un aumento della produzione di fosfatasi alcalina, rispetto al vettore metilato *in vitro*. In seguito a trattamento con Azacitidina, anche la sequenza metilata *in vitro* viene demetilata e si ha un aumento dell'attività della fosfatasi alcalina. Questi risultati dimostrano quindi che esiste un'interazione diretta dell'Azacitidina a livello dell'isola CpG 2 del promotore della PI-PLC β 1.

Su una casistica di 15 pazienti affetti da MDS sono quindi state analizzate le variazioni dei livelli di metilazione dell'isola 2 e dell'espressione della PI-PLC β 1b. Inoltre, si è analizzata la correlazione tra questi cambiamenti e lo stato clinico del paziente e come essi si pongono nei confronti della presenza o assenza della delezione mono-allelica della PI-PLC β 1.

Dai risultati ottenuti si può ipotizzare che i pazienti senza delezione, con un livello di metilazione basale alto rispetto ai donatori sani, potrebbero rispondere positivamente a trattamento con Azacitidina o comunque mantenere una risposta che si è avuta nella fase iniziale del trattamento. Pazienti con la delezione invece, anche se possono avere dei punti con miglioramenti ematologici, hanno mostrato a lungo termine una perdita della risposta e, molto frequentemente, un'evoluzione in AML.

Complessivamente, i risultati descritti indicano che la PI-PLC β 1 è alterata nelle MDS sia a livello genomico che trascrizionale. Sono state dunque effettuate analisi a livello proteico, per studiare l'eventuale coinvolgimento della PI-PLC β 1 nei meccanismi di proliferazione e differenziamento cellulare. Infatti, è stato dimostrato che la PI-PLC β 1 nucleare può indurre la progressione lungo il ciclo cellulare nelle cellule di eritroleucemia murina di Friend (Faenza et al., 2000); dal momento che, il complesso ciclina D3/cdk4 è attivato in modo specifico dalla PI-PLC β 1. Inoltre, è stato osservato che un altro dei bersagli molecolari della PI-PLC β 1 è la molecola CD24, che è coinvolta nei meccanismi di proliferazione e differenziamento delle cellule emopoietiche (Fiume et al., 2005). Quindi, i risultati ottenuti confermano che la via Akt/mTOR potrebbe diventare nel prossimo futuro un importante bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuove strategie nella terapia delle MDS.

Complessivamente, i dati riportati in questo studio mostrano l'importanza delle vie di segnalazione fosfoinositide-dipendente nelle MDS, indicando che la PI-PLC β 1 e l'asse Akt/mTOR potrebbero essere fattori prognostici e target terapeutici importanti per le MDS ad alto rischio.

BIBLIOGRAFIA

Abdulhaq, H. and Rossetti, J. M. (2007). The role of azacitidine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Investig Drugs* **16**, 1967-75.

Alvarez, S. and Cigudosa, J. C. (2005). Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* **23**, 18-25.

Bahk, Y. Y., Song, H., Baek, S. H., Park, B. Y., Kim, H., Ryu, S. H. and Suh, P. G. (1998). Localization of two forms of phospholipase C-beta1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochim Biophys Acta* **1389**, 76-80.

Barragan, M., de Frias, M., Iglesias-Serret, D., Campas, C., Castano, E., Santidrian, A. F., Coll-Mulet, L., Cosialls, A. M., Domingo, A., Pons, G. et al. (2006). Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C{beta}. *J Leukoc Biol* **80**, 1473-9.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. and Sultan, C. (1982). Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* **51**, 189-99.

Billottet, C., Grandage, V. L., Gale, R. E., Quattropiani, A., Rommel, C., Vanhaesebroeck, B. and Khwaja, A. (2006). A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene* **25**, 6648-59.

Bousquet, M., Recher, C., Queleen, C., Demur, C., Payrastre, B. and Brousset, P. (2005). Assessment of somatic mutations in phosphatidylinositol 3-kinase gene in human lymphoma and acute leukaemia. *Br J Haematol* **131**, 411-3.

Brandts, C. H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwable, J., Buerger, H., Muller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M. et al. (2005). Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res* **65**, 9643-50.

Cappellini, A., Tabellini, G., Zweyer, M., Bortul, R., Tazzari, P. L., Billi, A. M., Fala, F., Cocco, L. and Martelli, A. M. (2003). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway regulates cell cycle progression of HL60 human leukemia cells through cytoplasmic relocalization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) and control of cyclin D1 expression. *Leukemia* **17**, 2157-67.

Cocco, L., Manzoli, L., Palka, G. and Martelli, A. M. (2005). Nuclear phospholipase C beta1, regulation of the cell cycle and progression of acute myeloid leukemia. *Adv Enzyme Regul* **45**, 126-35.

Cocco, L., Martelli, A. M., Gilmour, R. S., Rhee, S. G. and Manzoli, F. A. (2001). Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochim Biophys Acta* **1530**, 1-14.

Daskalakis, M., Nguyen, T. T., Nguyen, C., Guldberg, P., Kohler, G., Wijermans, P., Jones, P. A. and Lubbert, M. (2002). Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* **100**, 2957-64.

Faenza, I., Bavelloni, A., Fiume, R., Lattanzi, G., Maraldi, N. M., Gilmour, R. S., Martelli, A. M., Suh, P. G., Billi, A. M. and Cocco, L. (2003). Up-regulation of nuclear PLCbeta1 in myogenic differentiation. *J Cell Physiol* **195**, 446-52.

Faenza, I., Matteucci, A., Manzoli, L., Billi, A. M., Aluigi, M., Peruzzi, D., Vitale, M., Castorina, S., Suh, P. G. and Cocco, L. (2000). A role for nuclear phospholipase Cbeta 1 in cell cycle control. *J Biol Chem* **275**, 30520-4.

Fiume, R., Faenza, I., Matteucci, A., Astolfi, A., Vitale, M., Martelli, A. M. and Cocco, L. (2005). Nuclear phospholipase C beta1 (PLCbeta1) affects CD24 expression in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* **280**, 24221-6.

Follo, M. Y., Finelli, C., Bosi, C., Martinelli, G., Mongiorgi, S., Baccarani, M., Manzoli, L., Blalock, W. L., Martelli, A. M. and Cocco, L. (2008). PI-PLCbeta-1 and activated Akt levels are linked to azacitidine responsiveness in high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **22**, 198-200.

Follo, M. Y., Finelli C, Clissa C, Mongiorgio S, Bosi C, Martinelli G, Baccarani M, Manzoli L, Martelli AM, Cocco L. (2008). Phosphoinositide-phospholipase C (PI-PLC) β 1 mono-allelic deletion is associated with myelodysplastic syndromes (MDS) evolution into acute myeloid leukemia (AML) *Journal of Clinical Oncology*.

Follo, M. Y., Mongiorgi, S., Bosi, C., Cappellini, A., Finelli, C., Chiarini, F., Papa, V., Libra, M., Martinelli, G., Cocco, L. et al. (2007). The Akt/mammalian target of rapamycin signal transduction pathway is activated in high-risk myelodysplastic syndromes and influences cell survival and proliferation. *Cancer Res* **67**, 4287-94.

Garcia-Manero, G., Kantarjian, H. M., Sanchez-Gonzalez, B., Yang, H., Rosner, G., Verstovsek, S., Rytting, M., Wierda, W. G., Ravandi, F., Koller, C. et al. (2006). Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* **108**, 3271-9.

Germing, U., Gattermann, N., Strupp, C., Aivado, M. and Aul, C. (2000). Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res* **24**, 983-92.

Giles, F. J. and Albitar, M. (2005). Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in leukemia. *Curr Mol Med* **5**, 653-61.

Grandage, V. L., Gale, R. E., Linch, D. C. and Khwaja, A. (2005). PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* **19**, 586-94.

Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M. M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D. et al. (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**, 2079-88.

Huang, W., Chang, H. Y., Fei, T., Wu, H. and Chen, Y. G. (2006). GSK3beta mediates suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN. In *Oncogene*.

Irvine, R. F. (2003). Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 349-60.

Kantarjian, H., Oki, Y., Garcia-Manero, G., Huang, X., O'Brien, S., Cortes, J., Faderl, S., Bueso-Ramos, C., Ravandi, F., Estrov, Z. et al. (2007). Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **109**, 52-7.

Knapp, W., Strobl, H. and Majdic, O. (1994). Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* **18**, 187-98.

Kowal-Vern, A., Mazzella, F. M., Cotelingam, J. D., Shrit, M. A., Rector, J. T. and Schumacher, H. R. (2000). Diagnosis and characterization of acute erythroleukemia subsets by determining the percentages of myeloblasts and proerythroblasts in 69 cases. *Am J Hematol* **65**, 5-13.

Kristiansen, G., Sammar, M. and Altevogt, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol* **35**, 255-62.

Kuendgen, A. and Lubbert, M. (2008). Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* **87**, 601-11.

Lee, C. H., Park, D., Wu, D., Rhee, S. G. and Simon, M. I. (1992). Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *J Biol Chem* **267**, 16044-7.

Liu, Z. and Roberts, T. M. (2006). Human tumor mutants in the p110alpha subunit of PI3K. *Cell Cycle* **5**, 675-7.

Lo Vasco, V. R., Calabrese, G., Manzoli, L., Palka, G., Spadano, A., Morizio, E., Guanciali-Franchi, P., Fantasia, D. and Cocco, L. (2004). Inositide-specific phospholipase c

beta1 gene deletion in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia* **18**, 1122-6.

Lo Vasco, V. R., Follo, M. Y. and Cocco, L. (2006). Reply to Herens et al. *Leukemia* **20**, 755.

Mantovani, I., Cappellini, A., Tazzari, P. L., Papa, V., Cocco, L. and Martelli, A. M. (2006). Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells. *J Cell Physiol* **207**, 836-44.

Manzoli, L., Billi, A. M., Rubbini, S., Bavelloni, A., Faenza, I., Gilmour, R. S., Rhee, S. G. and Cocco, L. (1997). Essential role for nuclear phospholipase C beta1 in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis. *Cancer Res* **57**, 2137-9.

Markovic, A., MacKenzie, K. L. and Lock, R. B. (2005). FLT-3: a new focus in the understanding of acute leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1168-72.

Martelli, A. M., Billi, A. M., Gilmour, R. S., Neri, L. M., Manzoli, L., Ognibene, A. and Cocco, L. (1994). Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend cells: phospholipase C beta down-regulation is related to cell differentiation. *Cancer Res* **54**, 2536-40.

Martelli, A. M., Billi, A. M., Manzoli, L., Faenza, I., Aluigi, M., Falconi, M., De Pol, A., Gilmour, R. S. and Cocco, L. (2000). Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) beta1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation. *FEBS Lett* **486**, 230-6.

Martelli, A. M., Fiume, R., Faenza, I., Tabellini, G., Evangelista, C., Bortul, R., Follo, M. Y., Fala, F. and Cocco, L. (2005a). Nuclear phosphoinositide specific phospholipase C (PI-PLC)-beta 1: a central intermediary in nuclear lipid-dependent signal transduction. *Histol Histopathol* **20**, 1251-60.

Martelli, A. M., Gilmour, R. S., Bertagnolo, V., Neri, L. M., Manzoli, L. and Cocco, L. (1992). Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* **358**, 242-5.

Martelli, A. M., Manzoli, L. and Cocco, L. (2004). Nuclear inositides: facts and perspectives. *Pharmacol Ther* **101**, 47-64.

Martelli, A. M., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P. L., Evangelisti, C. and Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 911-28.

Martelli, A. M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P. L., Cappellini, A., Billi, A. M. and Cocco, L. (2005b). Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol* **20**, 239-52.

Matteucci, A., Faenza, I., Gilmour, R. S., Manzoli, L., Billi, A. M., Peruzzi, D., Bavelloni, A., Rhee, S. G. and Cocco, L. (1998). Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C beta 1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells. *Cancer Res* **58**, 5057-60.

Min, Y. H., Eom, J. I., Cheong, J. W., Maeng, H. O., Kim, J. Y., Jeung, H. K., Lee, S. T., Lee, M. H., Hahn, J. S. and Ko, Y. W. (2003). Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* **17**, 995-7.

Mori, N., Morosetti, R., Hoflehner, E., Lubbert, M., Mizoguchi, H. and Koeffler, H. P. (2000). Allelic loss in the progression of myelodysplastic syndrome. *Cancer Res* **60**, 3039-42.

Nissen-Druey, C., Tichelli, A. and Meyer-Monard, S. (2005). Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol* **113**, 5-96.

Nyakern, M., Tazzari, P. L., Finelli, C., Bosi, C., Follo, M. Y., Grafone, T., Piccaluga, P. P., Martinelli, G., Cocco, L. and Martelli, A. M. (2006). Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia* **20**, 230-8.

Park, D., Jhon, D. Y., Lee, C. W., Lee, K. H. and Rhee, S. G. (1993). Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**, 4573-6.

Peruzzi, D., Aluigi, M., Manzoli, L., Billi, A. M., Di Giorgio, F. P., Morleo, M., Martelli, A. M. and Cocco, L. (2002). Molecular characterization of the human PLC beta1 gene. *Biochim Biophys Acta* **1584**, 46-54.

Peruzzi, D., Calabrese, G., Faenza, I., Manzoli, L., Matteucci, A., Gianfrancesco, F., Billi, A. M., Stuppia, L., Palka, G. and Cocco, L. (2000). Identification and chromosomal localisation by fluorescence in situ hybridisation of human gene of phosphoinositide-specific phospholipase C beta(1). *Biochim Biophys Acta* **1484**, 175-82.

Platzbecker, U., Haase, M., Herbst, R., Hanel, A., Voigtmann, K., Thiede, C. H., Mohr, B., Schleyer, E., Leopold, T., Orth, M. et al. (2005). Activity of sirolimus in patients with myelodysplastic syndrome--results of a pilot study. *Br J Haematol* **128**, 625-30.

Razzini, G., Brancaccio, A., Lemmon, M. A., Guarnieri, S. and Falasca, M. (2000). The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta(1). *J Biol Chem* **275**, 14873-81.

Recher, C., Beyne-Rauzy, O., Demur, C., Chicanne, G., Dos Santos, C., Mas, V. M., Benzaquen, D., Laurent, G., Huguet, F. and Payrastre, B. (2005). Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* **105**, 2527-34.

Ricciardi, M. R., McQueen, T., Chism, D., Milella, M., Estey, E., Kaldjian, E., Sebolt-Leopold, J., Konopleva, M. and Andreeff, M. (2005). Quantitative single cell determination of

ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* **19**, 1543-9.

Rizvi, M. A., Ghias, K., Davies, K. M., Ma, C., Weinberg, F., Munshi, H. G., Krett, N. L. and Rosen, S. T. (2006). Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C β inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther* **5**, 1783-9.

Samstag, Y. and Nebl, G. (2005). Ras initiates phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/PKB mediated signalling pathways in untransformed human peripheral blood T lymphocytes. *Adv Enzyme Regul* **45**, 52-62.

Soriano, A. O., Yang, H., Faderl, S., Estrov, Z., Giles, F., Ravandi, F., Cortes, J., Wierda, W. G., Ouzounian, S., Quezada, A. et al. (2007). Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* **110**, 2302-8.

Sujobert, P., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Hayflick, J. S., Prie, N., Verdier, F., Vanhaesebroeck, B., Muller, O., Pesce, F., Ifrah, N. et al. (2005). Essential role for the p110 δ isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* **106**, 1063-6.

Tabellini, G., Tazzari, P. L., Bortul, R., Evangelisti, C., Billi, A. M., Grafone, T., Martinelli, G., Baccarani, M. and Martelli, A. M. (2005). Phosphoinositide 3-kinase/Akt inhibition increases arsenic trioxide-induced apoptosis of acute promyelocytic and T-cell leukaemias. *Br J Haematol* **130**, 716-25.

Tee, A. R. and Blenis, J. (2005). mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 29-37.

Trost, D., Hildebrandt, B., Muller, N., Germing, U. and Royer-Pokora, B. (2004). Hidden chromosomal aberrations are rare in primary myelodysplastic syndromes with evolution to acute myeloid leukaemia and normal cytogenetics. *Leuk Res* **28**, 171-7.

Vardiman, J. W., Harris, N. L. and Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292-302.

Vega, F., Medeiros, L. J., Leventaki, V., Atwell, C., Cho-Vega, J. H., Tian, L., Claret, F. X. and Rassidakis, G. Z. (2006). Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res* **66**, 6589-97.

Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D. and Raymond, E. (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* **16**, 525-37.

Wenger, R. H., Rochelle, J. M., Seldin, M. F., Kohler, G. and Nielsen, P. J. (1993). The heat stable antigen (mouse CD24) gene is differentially regulated but has a housekeeping promoter. *J Biol Chem* **268**, 23345-52.

Xu, A., Suh, P. G., Marmy-Conus, N., Pearson, R. B., Seok, O. Y., Cocco, L. and Gilmour, R. S. (2001). Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* **21**, 2981-90.

Xu, R. H., Pelicano, H., Zhang, H., Giles, F. J., Keating, M. J. and Huang, P. (2005). Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia* **19**, 2153-8.

Yee, K. W., Zeng, Z., Konopleva, M., Verstovsek, S., Ravandi, F., Ferrajoli, A., Thomas, D., Wierda, W., Apostolidou, E., Albitar, M. et al. (2006). Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* **12**, 5165-73.

Zeng, Z., Samudio, I. J., Zhang, W., Estrov, Z., Pelicano, H., Harris, D., Frolova, O., Hail, N., Jr., Chen, W., Kornblau, S. M. et al. (2006). Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* **66**, 3737-46.