

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e
Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore**

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche Umane e Molecolari

Coordinatore Prof. Lucio Cocco

**IL RUOLO DELLA PKC ϵ NEL DIFFERENZIAMENTO
ERITROIDE E MEGACARIOCITARIO**

TESI DI DOTTORATO

BIO/16

Presentata dal Dott.

GIULIANA GOBBI

Relatore Chiar.mo Prof.

MARCO VITALE

Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Scienze Medico-Forensi
Sezione di Anatomia Umana, Università di Parma

A.A. 2005-2006

IL RUOLO DELLA PKC ϵ NEL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE E MEGACARIOCITARIO

Parte dei risultati che saranno qui esposti sono stati pubblicati sulla rivista scientifica internazionale:

Mirandola P, Gobbi G, Ponti C Sponzilli I, Cocco L, Vitale M. PKC epsilon controls protection against TRAIL in erythroid progenitors. BLOOD. 2006; 107(2): 508-513.

INDICE

INTRODUZIONE	1
Differenziamento ematopoietico	1
Citochine	6
Eritropoietina (EPO)	7
Trombopoietina (TPO)	8
Recettori per citochine	10
Recettori per HGF	12
EpoR	16
c-Mpl	18
Famiglia PKC	22
Dominio C1	25
Dominio C2	26
PKC ϵ	28
Famiglia TNF	29
TRAIL	30
Le funzioni di TRAIL	32

Struttura dei recettori di TRAIL	34
Distribuzione tissutale dei recettori di TRAIL	37
La via di segnalazione di TRAIL	38
Famiglia Bcl-2	39
Proteine antiapoptotiche multidominio	43
Proteine proapoptotiche multidominio	44
Proteine solo-BH3	46
Meccanismo apoptotico:il controllo della morte cellulare	48
Apoptosi in cellule di tipo I o di tipo II	54
SCOPO DELLA TESI	59
MATERIALI E METODI	61
Purificazione delle cellule CD34 ⁺	61
Colture cellulari e trattamenti	61
Morfologia cellulare	62
Analisi in citometria a flusso	62
Disegno degli siRNA e transfezione	63
Analisi semiquantitative della trascrizione	64
Western blot	64
Valutazione dell'apoptosi	65

RISULTATI	66
PKCϵ controlla la sensibilita' a TRAIL in progenitori eritroidi	66
TRAIL induce apoptosi in cellule eritromieloidi	67
PKC ϵ riduce l'apoptosi mediata da TRAIL in cellule eritromieloidi	68
TRAIL induce apoptosi di eritroblasti derivanti da cellule CD34	70
EPO up-regola PKC ϵ che induce resistenza a TRAIL	73
PKC ϵ modula i livelli di Bcl-2 nei progenitori eritroidi	75
I livelli di espressione di PKCϵ modulano il differenziamento MK	77
I livelli di PKC ϵ sono modulati durante il differenziamento MK	77
TRAIL favorisce il differenziamento MK indotto da TPO	80
I livelli di PKC ϵ interferiscono con il differenziamento MK	81
PKC ϵ modula Bcl-xL nei progenitori MK	84
DISCUSSIONE	86
CONCLUSIONI	90
ABBREVIAZIONI	92
BIBLIOGRAFIA	96

ALLEGATI 110

Elenco delle Pubblicazioni del triennio 2003-2006

Articolo attinente all'argomento trattato in questa tesi pubblicato
sulla rivista *Blood*

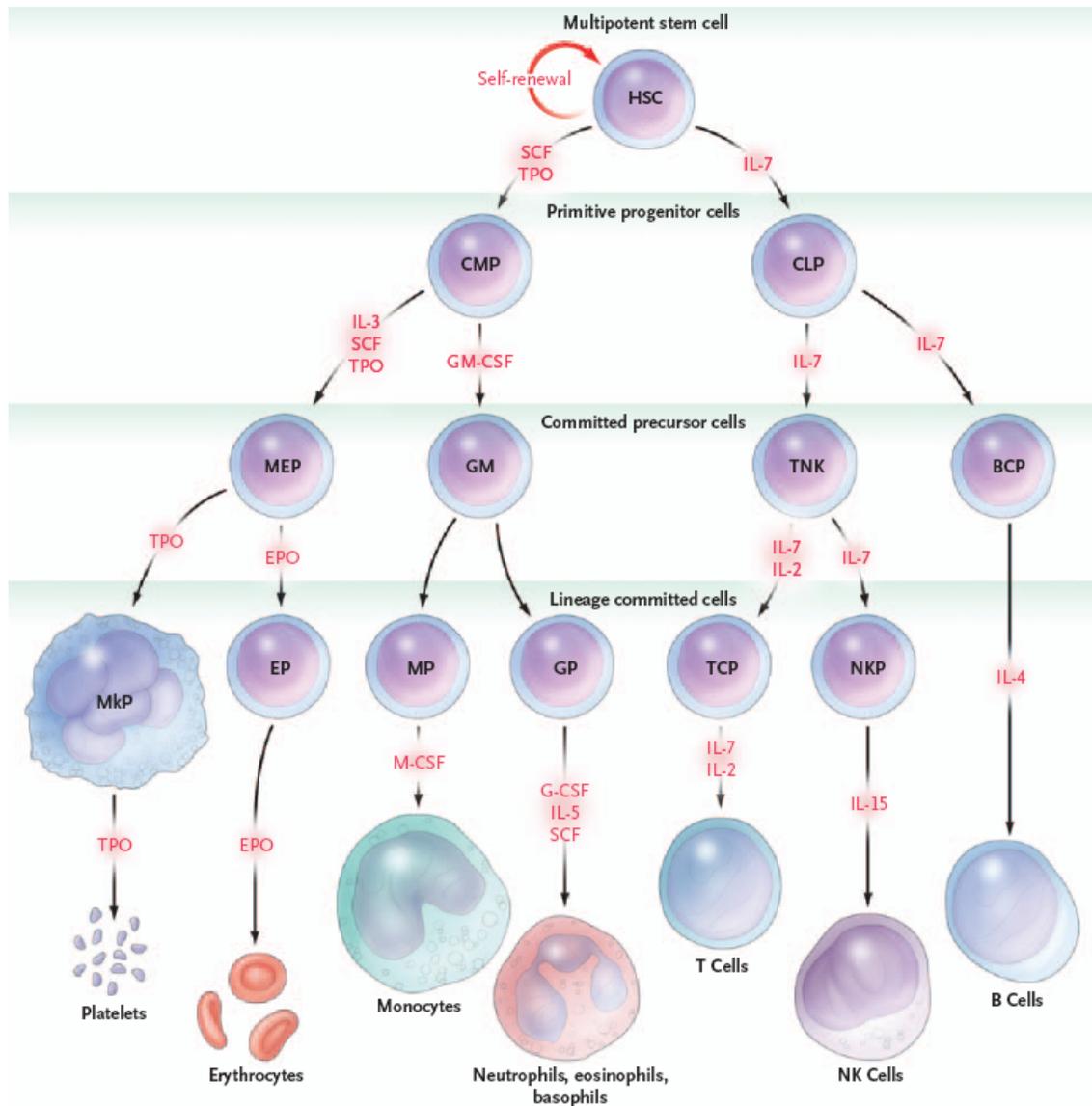
Editoriale della rivista *Blood* dedicato all'articolo allegato

INTRODUZIONE

Differenziamento ematopoietico

Un'accurata regolazione dell'ematopoiesi è fondamentale per il mantenimento dello stato di salute. Ogni giorno un soggetto adulto sano produce $\sim 2 \times 10^{11}$ eritrociti, $\sim 1 \times 10^{11}$ leucociti e $\sim 1 \times 10^{11}$ piastrine: questi valori possono aumentare anche più di 10 volte in caso di necessità.

Tutti gli elementi del sangue derivano da cellule staminali ematopoietiche (HSC) (**Figura 1**), funzionalmente definite come cellule in grado di ricostituire l'ematopoiesi se trapiantate in un soggetto irradiato (Shizuru et al., *Annu Rev Med* 2005). Le cellule staminali midollari attive sono sottoposte ad una serie di “decisioni” differenziative, che le inducono a perdere progressivamente la loro capacità “multipotente”, mentre effettuano un ampio numero di divisioni cellulari. La capacità di espansione cellulare che caratterizza l'ematopoiesi è ben comprensibile se si considera che giornalmente da poche migliaia di HSC umane si ottengono 4×10^{11} cellule del sangue (Schmidt et al., *Blood* 2002).



Adattata da Kaushansky, *N Engl J Med* 2006

Figura 1. Schema generale dell'ematopoiesi. Lo sviluppo delle cellule del sangue procede da una cellula staminale ematopoietica (HSC), che può replicarsi o differenziare in cellule progenitrici di varie filiere: un progenitore linfoide comune (CLP) o un progenitore mieloide comune (CMP). Queste cellule poi originano progenitori più differenziati, compresi quelli indirizzati alle filiere delle cellule T e delle cellule natural killer (TNK), granulociti e macrofagi (GM), megacariociti e cellule eritroidi (MEPs). Infine, queste cellule danno origine a progenitori di una unica filiera per cellule B (BCP), cellule NK (NKP), cellule T (TCP), granulociti (GP), monociti (MP), eritrociti (EP), e megacariociti (Mkp). In rosso sono indicate le citochine e i fattori di crescita che favoriscono sopravvivenza, proliferazione, o differenziamento di ciascun tipo di cellula. Per semplicità non sono riportati i tre tipi di progenitori dei granulociti; in realtà, esistono progenitori diversi per neutrofili, eosinofili, e basofili, favoriti da varie citochine e fattori di crescita (IL-5 per gli eosinofili, SCF per basofili, e G-CSF per neutrofili).

Sono stati identificati tre principali meccanismi che influenzano sia il differenziamento che i livelli di proliferazione delle HSC e della loro progenie:

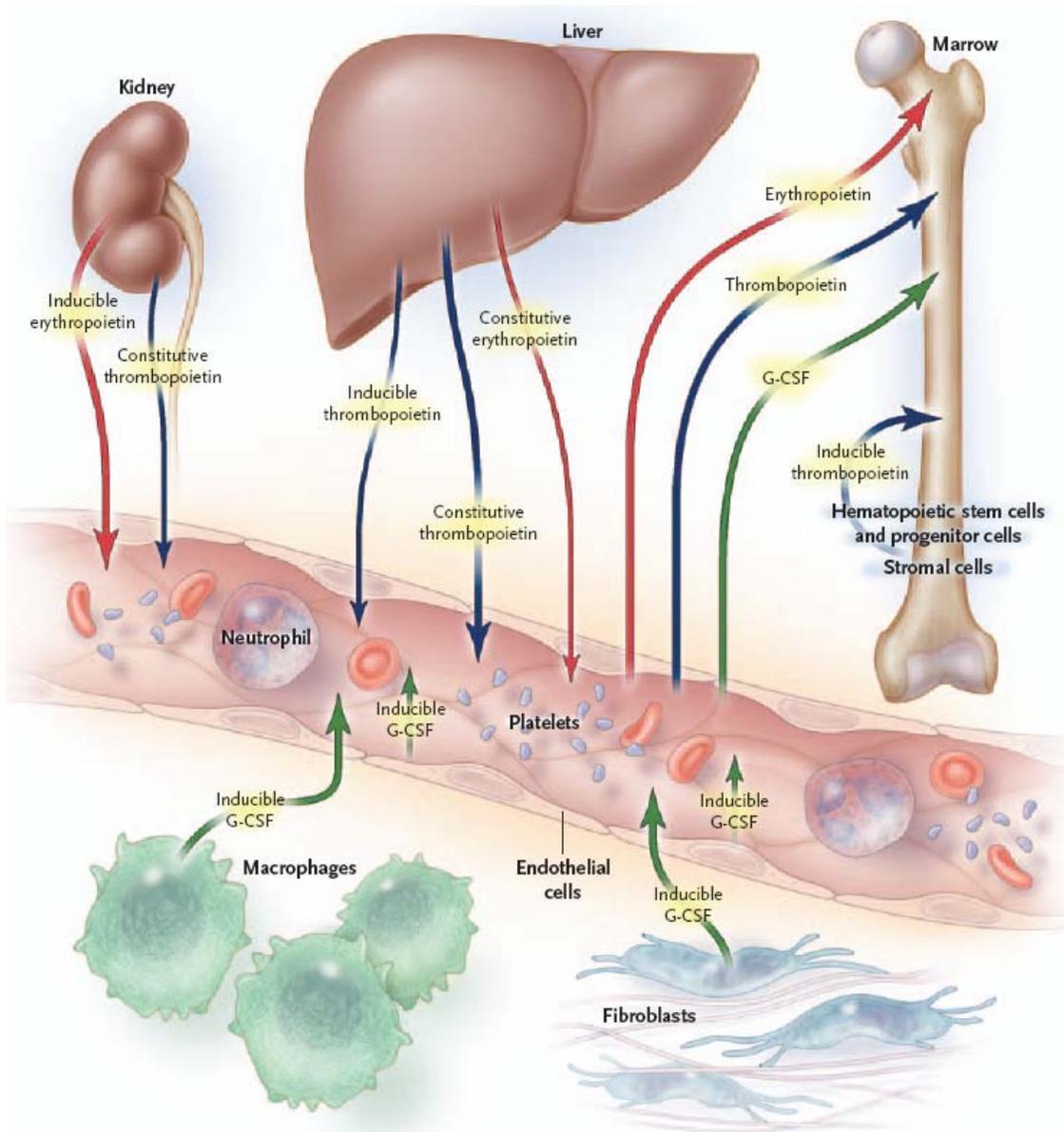
1. l'aumento o la diminuzione stocastica di fattori di trascrizione specifici per una certa filiera (Cantor & Orkin, *Curr Opin Genet Dev* 2001),
2. l'interazione fra le cellule ematopoietiche e lo stroma delle nicchie midollari (Taichman, *Blood* 2005; Arai et al., *Trends Cardiovasc Med* 2005),
3. il preciso controllo dei livelli dei fattori di crescita ematopoietici (HGF) (Kaushansky, *Williams hematology* 2005).

Gli HGF sono un gruppo di glicoproteine acide che, legandosi ad uno specifico recettore espresso sulla superficie cellulare, agiscono mediante un sistema sia endocrino che paracrino nella regolazione della crescita e del differenziamento delle HSC e della loro progenie. A loro volta sono regolati prevalentemente dalla necessità fisiologica dei tipi cellulari che sono sottoposti alla loro azione (**Figura 2**). Gli HGFs legano diversi membri della famiglia dei recettori citochinici di tipo I con alta affinità, evento che induce cambiamenti conformazionali nel recettore e conseguente attivazione di segnali biochimici per la sopravvivenza cellulare, la proliferazione, il differenziamento e/o l'attivazione. Un modello generale per la regolazione della produzione di HGF, la loro azione endocrina o paracrina, e il loro effetto sulla cellula bersaglio è schematizzato nella **Figura 3**.

Eritropoietina (EPO), fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) e trombopoietina (TPO) sono rispettivamente i principali regolatori della produzione di eritrociti, neutrofili e piastrine. I loro livelli plasmatici e midollari sono inversamente proporzionali alla massa corporea totale dei rispettivi tipi cellulari maturi (Krantz, *Blood* 1991; Anderlini et al., *Blood* 1996; Kaushansky, *N Engl J Med* 1998).

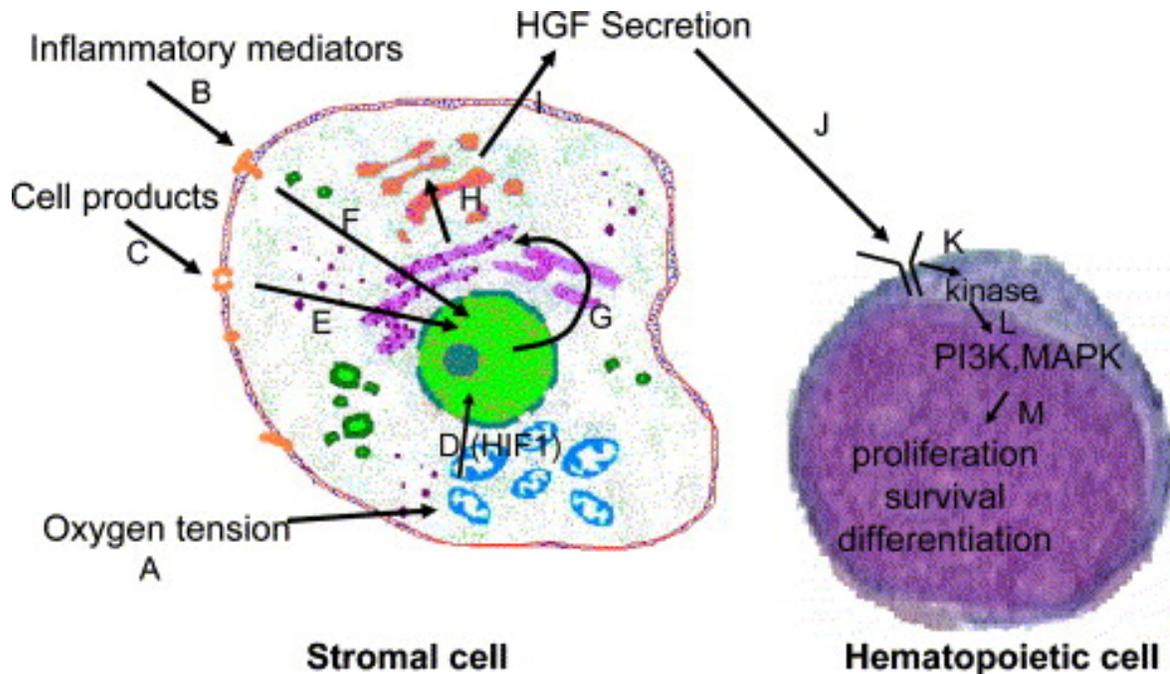
La produzione di HGF è regolata a diversi livelli molecolari e cellulari: trascrizione genica, stabilità del messaggero, sintesi proteica e consumo periferico.

Numerose patologie mieloproliferative sono correlate ad alterazioni di uno di questi passaggi della regolazione ematopoietica.



Adattata da Kaushansky, *N Engl J Med* 2006

Figura 2. Regolazione della produzione dei fattori di crescita ematopoietici. La produzione di fattori di crescita dai vari tessuti e cellule (freccie) è sia costitutiva che inducibile ed è soggetta al consumo periferico. La produzione di EPO (freccie rosse) è inducibile dall'ipossia nel rene ed è costitutiva nel fegato (10 % di EPO totale). Il G-CSF (freccie verdi) è soprattutto inducibile in tessuti dai fibroblasti e macrofagi e da cellule endoteliali mediante mediatori dell'infiammazione (IL-1, IL-6, e $TNF\alpha$). La TPO (freccie blu) è prodotta costitutivamente da fegato (approssimativamente il 50 % del livello basale di TPO) e rene ed è inducibile nel fegato da mediatori dell'infiammazione (specialmente IL-6) e da cellule stromali di midollo osseo in seguito a trombocitopenia. Inoltre, sia G-CSF che TPO sono rimossi dalla circolazione da cellule mature (neutrofili e piastrine) che esprimono sulla superficie gli specifici recettori. Le freccie indicano la produzione e la secrezione dei fattori di crescita ematopoietici.



Adattata da Kaushansky, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2006

Figura 3. Schema generale della fisiologia dei fattori di crescita ematopoietici. Sono stati individuati diverse modalità di regolazione delle citochine, quali: **A.** tensione di ossigeno, che agisce tramite il fattore inducibile dall'ipossia (HIF1) sulla produzione di EPO; **B.** mediatori dell'inflammatione, che agiscono sulla produzione di G-CSF e TPO; **C.** costituenti delle cellule del sangue, che stimolano la produzione di TPO. Quando i mediatori legano i loro corrispondenti recettori sulla superficie cellulare, o intervengono nella segnaletica intracellulare [**D**], producono un aumento della trascrizione genica dei fattori di crescita (**D, E e F**), trasferimento dell'mRNA (**G e H**) e secrezione proteica (**I**). I fattori di crescita poi agiscono localmente (TPO, G-CSF) o a distanza (EPO, G-CSF, TPO) mediante il legame ai loro recettori sulle cellule ematopoietiche staminali o progenitrici (**J**), trasducendo i segnali che richiedono l'attivazione immediata di una chinasi legata al recettore (**K**) e mediatori a valle (**L**) compresi le fosfoinositolo-3-chinasi (PI3K) e le proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPK), che poi agiscono sui livelli dei fattori di trascrizione per la sopravvivenza cellulare, proliferazione, differenziamento o attivazione (**M**).

Citochine

Le citochine sono una classe eterogenea di proteine secretorie prodotte da vari tipi di cellule ed hanno la funzione di condizionare la risposta biologica delle specifiche cellule verso cui sono indirizzate. Si comportano quindi da "mediatori" tra le diverse cellule ed agiscono da segnali inter-cellulari.

Questa famiglia di proteine, strutturalmente correlate, svolge un ruolo molto importante nella regolazione della morte cellulare, nella risposta immunitaria innata e specifica, e nell'infiammazione (Wiley et al., *Immunity* 1995; LeBlanc & Ashkenazi, *Cell Death Differ* 2003).

Presentano alcune caratteristiche comuni:

- la loro secrezione è in genere un fenomeno di breve durata ed autolimitato. In generale le citochine sono prodotte ex-novo dalla trascrizione dei loro geni e non vengono accumulate nella cellula come molecole preformate;
- le azioni svolte dalle citochine sono spesso pleiotropiche e ridondanti: la stessa citochina è in grado di agire su tipi cellulari diversi e citochine diverse possono avere la stessa azione biologica;
- influenzano spesso la sintesi e l'azione di altre citochine, possono cioè operare in modo sinergico o antagonizzarsi a vicenda;
- possono agire in modo autocrino, paracrino o endocrino;
- al pari di altri ormoni polipeptidici, svolgono la loro azione legandosi a recettori specifici espressi sulla membrana delle cellule bersaglio, la cui espressione è regolata da segnali esterni alla cellula;
- la risposta della cellula bersaglio consiste nella maggior parte dei casi nella modulazione dell'espressione genica;
- le citochine si comportano per molti tipi cellulari come fattori di crescita o come regolatori della divisione cellulare. Per altri tipi cellulari possono invece innescare meccanismi che ne mediano la morte. In molti casi l'effetto biologico dipende dalla quantità di citochina.

In base alle principali funzioni biologiche svolte, le citochine possono quindi essere classificate in 3 categorie:

1. *Citochine Infiammatorie*, con azione di mediatori e regolatori dell'immunità innata, prodotte principalmente da macrofagi e da cellule del sistema monocito-macrofagico per potenziare o inibire le reazioni infiammatorie (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, chemochine, IFN- α , IFN- β).
2. *Citochine Immunitarie*, ovvero mediatori e regolatori dell'immunità specifica, prodotte soprattutto da linfociti T in risposta ad un riconoscimento antigenico specifico, per stimolare e sfruttare al massimo le risposte infiammatorie (IL-2, IL-4, TGF- β , IFN- γ , LT, IL-5).
3. *Citochine Ematopoietiche*, che stimolano l'emopoiesi, prodotte da cellule stromali del midollo osseo, leucociti, rene e fegato (EPO, TPO, SCF, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-3, IL-7).

Eritropoietina (EPO)

I livelli di EPO nel sangue (valore normale: 20mU per millilitro) sono inversamente correlati all'ossigenazione tissutale – il livello può aumentare fino a 20.000 mU per millilitro in risposta ad anemia o ipossia arteriosa (Krantz, *Blood* 1991). Le cellule interstiziali juxtatubulari della porzione corticale del rene, che producono approssimativamente il 90% dell'EPO presente nel sangue (**Figura 2**), sono sensibili ai livelli di ossigeno grazie ad HIF-1 α , una prolil idrossilasi ossigeno-dipendente di recente scoperta che regola la stabilizzazione del principale fattore di trascrizione per EPO. Appena idrossilato, HIF-1 α lega la proteina von Hippel-Lindau (vHL) inducendone la distruzione mediata da ubiquitina (Ratcliffe et al., *J Exp Biol* 1998). In condizioni di bassa tensione di ossigeno l'idrossilasi è inattiva; di conseguenza HIF-1 α non è idrossilato e non può legare vHL, che mantiene la sua stabilità e capacità di indurre la produzione di EPO. Questo meccanismo è responsabile delle eritrocitosi associate all'altitudine, di patologie cardiache o polmonari dovute a ipossia o a varianti emoglobiniche con bassa affinità per l'ossigeno. Recentemente è stata scoperta una forma familiare di eritrocitosi caratterizzata da una mutazione missense nel gene *vHL* e da alti livelli di EPO (Pastore et al., *Blood* 2003).

EPO promuove la proliferazione dei progenitori eritroidi riducendo i livelli degli inibitori del ciclo cellulare, aumentando la trascrizione delle cicline e sostenendo la loro sopravvivenza mediante l'induzione della proteina anti-apoptotica Bcl-xL (Krantz, *Blood* 1991). In studi effettuati su topi è stato dimostrato che la soppressione del gene per l'eritropoietina o per il suo recettore causa anemia severa e morte (Wu et al., *Cell* 1995). La somministrazione di EPO aumenta il numero di cellule progenitrici eritroidi, che differenziano in normoblasti, eliminano il nucleo e lasciano il midollo osseo (Krantz, *Blood* 1991). Dopo 1-2 settimane dalla somministrazione dell'ormone, il numero dei reticolociti aumenta sia per la maggiore produzione di eritroblasti sia per la loro prematura uscita dal midollo osseo.

Inizialmente si riteneva che EPO fosse un ormone specifico per la linea eritroide, ma in seguito si è riscontrata la presenza di mRNA per EPO ed il suo recettore anche in cellule neuronali e gliali del sistema nervoso centrale e della retina (Digicaylioglu et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; Juul et al., *Early Hum Dev* 1998). Inoltre, l'ormone protegge i neuroni da stimoli nocivi (Brines et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000) ed induce la loro proliferazione in caso di danno neuronale (Kretz A et al., *Mol Cell Neurosci* 2005). Studi preclinici hanno dimostrato che, in seguito a somministrazione, EPO esogena attraversa la barriera emato-encefalica e svolge un ruolo protettivo su neuroni ischemici.

Trombopoietina (TPO)

Il principale regolatore della produzione di piastrine è la TPO (Kaushansky, *N Engl J Med* 1998). Favorisce la sopravvivenza e la proliferazione dei progenitori dei megacariociti mediante numerosi meccanismi coinvolti anche con EPO e G-SCF, quali l'aumento dell'espressione della ciclina D, regolatore del ciclo cellulare, della molecola anti-apoptotica Bcl-xL e la soppressione di p27KIP, inibitore del ciclo cellulare. *In vitro*, TPO induce il differenziamento dei progenitori in megacariociti, ciascuno capace di produrre migliaia di piastrine. *In vivo* è un potente stimolo per la produzione di piastrine, causa trombocitosi se somministrato all'animale o all'uomo. Favorisce l'aggregazione piastrinica indotta da bassi livelli di trombina, collagene, o ADP, attivando la via segnalatica di PI3K (Kojima et al., *Exp Hematol* 2001). Studi effettuati su topo hanno dimostrato che la soppressione del gene per la trombopoietina o del suo recettore riduce i

livelli di produzione dei megacariociti e delle piastrine di circa il 10% rispetto al normale (de Sauvage et al., *J Exp Med* 1996). TPO svolge un ruolo importante, oltre che nella stimolazione della megacariocitopoiesi, anche nella sopravvivenza ed espansione delle cellule staminali ematopoietiche (Sitnicka et al., *Blood* 1996). Inoltre, la soppressione genica di TPO o del suo recettore in topi riduce di 7-8 volte il numero delle cellule staminali in grado di ripopolare il midollo osseo e diminuisce di 17 volte l'espansione del numero di cellule staminali ematopoietiche in seguito a trapianto (Solar et al., *Blood* 1998; Fox et al., *J Clin Invest* 2002).

Gli effetti di TPO sulle cellule staminali sono mediati da un aumento nell'espressione o nella localizzazione nucleare di numerosi fattori di trascrizione e da una produzione autocrina di VEGF (Kaushansky, *Ann N Y Acad Sci* 2005). La causa della trombocitopenia amegacariocitica congenita è stata descritta come una mancanza del recettore per la TPO (Ballmaier et al., *Blood* 2001).

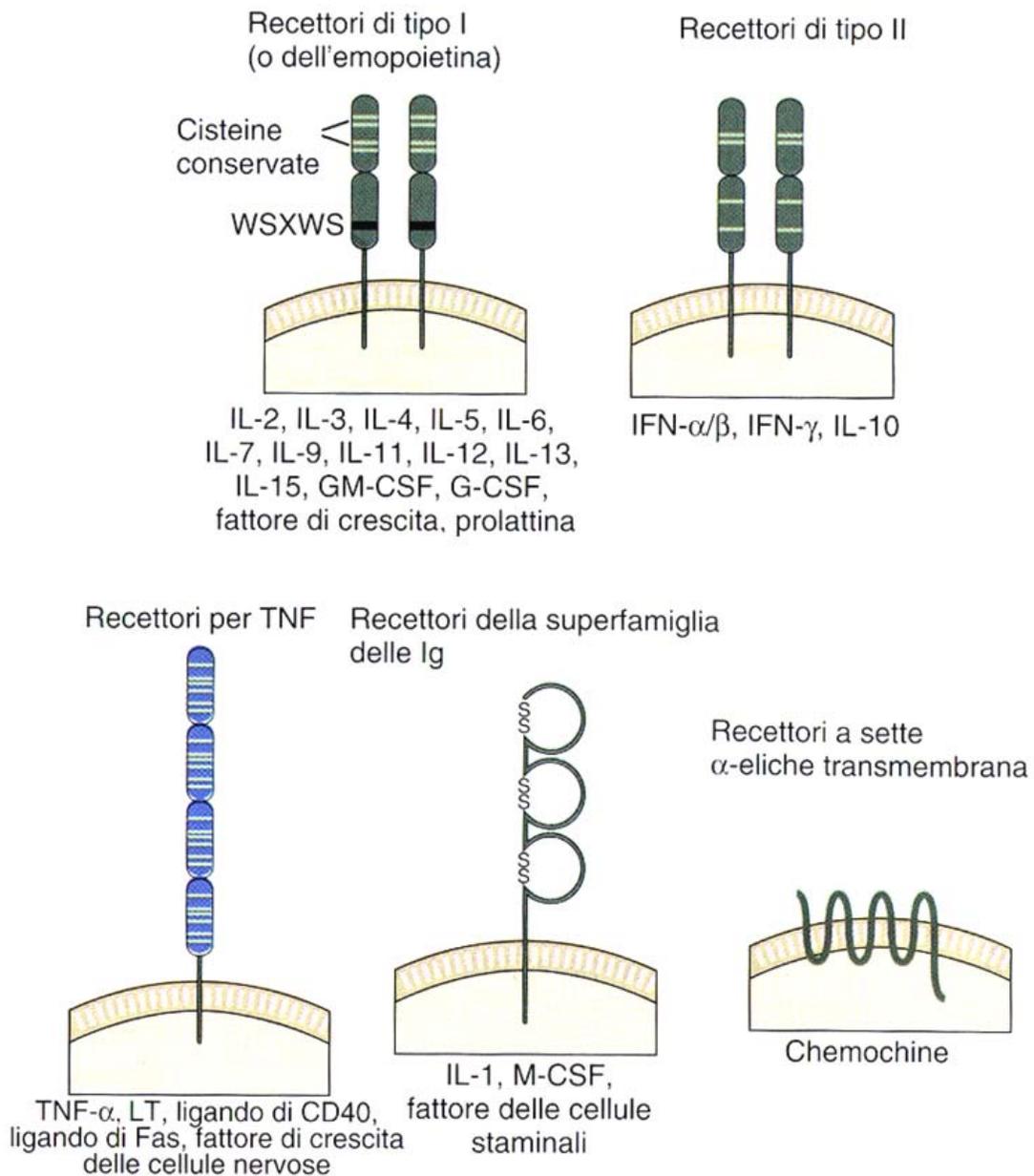
I livelli di TPO nel sangue sono inversamente correlati al numero di piastrine circolanti ed al numero di megacariociti nel midollo osseo (Kaushansky, *N Engl J Med* 1998); diversamente dalla produzione di EPO, la regolazione dei livelli di TPO è complessa (**Figura 2**). Almeno la metà della produzione di TPO avviene nel fegato (Qian et al., *Blood* 1998), ma sia i reni che i muscoli scheletrici producono questo ormone. Le piastrine mature ed i megacariociti presentano i recettori per TPO e sono in grado di rimuoverla dalla circolazione (Yang et al., *Br J Haematol* 1999). Infatti, una delle cause della relazione inversa tra numero di piastrine e livelli di TPO è l'utilizzazione dell'ormone circolante. Oltre a questo sistema di bilanciamento tra la produzione ed il catabolismo di TPO, le cellule stromali del midollo osseo possono aumentarne notevolmente la produzione in stato di severa trombocitopenia (McCarty et al., *Blood* 1995; Sungaran et al., *Blood* 1997). Inoltre, la produzione epatica di TPO può essere indotta da mediatori dell'infiammazione, quali IL-6 (Wolber & Jelkmann, *J Interferon Cytokine Res* 2000; Kaser et al., *Blood* 2001), dando una spiegazione molecolare alla trombocitosi comunemente riscontrata in patologie come l'artrite reumatoide, il morbo di Crohn ed altre caratterizzate da infezioni e stati infiammatori (Griesshammer et al., *J Intern Med* 1999).

Recettori per citochine

Tutti i recettori per le citochine sono costituiti da una o più proteine transmembrana, la cui porzione extracellulare è responsabile del legame della citochina, mentre la porzione citoplasmatica è deputata all'innescò della cascata di segnalazione intracellulare. La classificazione dei recettori per le citochine più usata si basa sull'omologia strutturale tra i domini extracellulari di questi recettori.

Si distinguono 5 famiglie di recettori (**Figura 4**):

1. *Recettori di tipo I*, contengono una o più copie di un dominio dotato di due coppie di residui di cisteina e di una sequenza più prossimale rispetto alla membrana composta da triptofano-serina-X-triptofano-serina (WSXWS). Legano molecole che si ripiegano in 4 domini ad α -elica e presentano una struttura multimerica.
2. *Recettori di tipo II*: hanno struttura simile al recettori di tipo I ma non possiedono il dominio WSXWS.
3. *Superfamiglia delle immunoglobuline*, presentano domini extracellulari tipici delle immunoglobuline.
4. *Recettori accoppiati alle proteine G*, caratterizzati da sette domini ad α -elica transmembrana, sono preposti a mediare risposte rapide ma transitorie, legano citochine ad azione chemiotattica (chemochine).
5. *Recettori per TNF*, caratterizzati da domini extracellulari conservati ricchi di cisteine; a seguito dell'interazione col ligando, attivano una cascata di segnalazione intracellulare in grado di indurre apoptosi o di promuovere l'espressione genica.



Adattata da Abbas et al., *Immunologia cellulare e molecolare*. 2001

Figura 4. Rappresentazione schematica delle 5 famiglie dei recettori delle citochine e rispettivi ligandi.

Recettori per HGF

I recettori per i fattori di crescita ematopoietici appartengono alla famiglia dei recettori di tipo I, sono specifici per EPO, TPO, diversi fattori stimolanti le colonie (CSF), numerose interleuchine, e varie citochine ed ormoni strutturalmente correlati, come ad esempio l'ormone della crescita (GH) (Cosman, *Cytokine* 1993) (**Figura 4**). Ciascuna di queste proteine transmembrana comprende uno o due domini extracellulari, per il legame con la citochina, contenenti approssimativamente 200 aa, un dominio transmembrana di 20-25 residui, e un dominio intracellulare di 100-500 aa con due motivi (box 1 e box 2) ai quali si associano le chinasi della famiglia JAK (**Figura 5**).

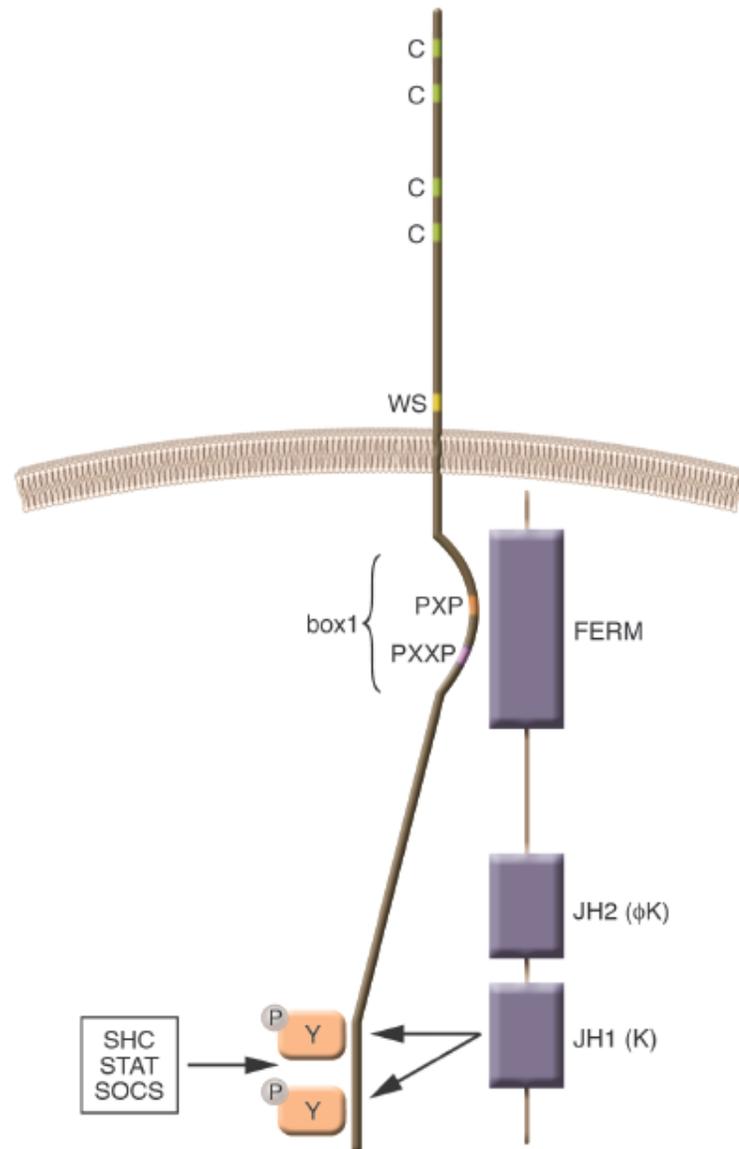
L'unità funzionale dei recettori per EPO, G-CSF e TPO è un omodimero (Livnah et al., *Science* 1999); il legame di una singola molecola di un fattore di crescita ematopoietico al recettore omodimerico ne induce una modificazione conformazionale, giustapponendo le due molecole della famiglia di JAK, che si attivano vicendevolmente mediante una cross-fosforilazione. L'attivazione delle JAK innesca una cascata di fosforilazione di numerose molecole a valle (segnalica secondaria), che promuovono la sopravvivenza, la proliferazione ed il differenziamento cellulare. Le vie di segnalica comprendono o direttamente fattori di trascrizione (Ihle & Kerr, *Trends Genet* 1995) o messaggeri secondari quali PI3K (Miyakawa et al., *J Biol Chem* 2001) e MAPK (Miura et al., *J Biol Chem* 1994), ciascuno dei quali a sua volta attiva sottogruppi di molecole che appartengono al terzo livello di segnalica (**Figure 6**). Fra queste, i fattori di trascrizione (Kirito et al., *Blood* 2003; Mora-Garcia & Sakamoto, *J Biol Chem* 2000; Dijkers et al., *Mol Cell Biol* 2000), gli attivatori (ciclina) (Henry et al., *Exp Cell Res* 2004) e gli inibitori (p27^{Kip}) (Bouscary et al., *Blood* 2003) del ciclo cellulare, le molecole anti-apoptotiche (Bcl-xL) (Socolovsky et al., *Cell* 1999), e altri fattori di crescita (TGF β ed EGF) (Yanagida et al., *Br J Haematol* 1997; Kirito et al., *Blood* 2005) sono i responsabili ultimi degli effetti indotti dal legame del fattore di crescita ematopoietico al suo recettore.

Nelle cellule ematopoietiche sono state individuate numerose chinasi coinvolte in processi patologici. Recentemente, è stata descritta una mutazione puntiforme nel dominio di regolazione del gene *JAK2* (nel quale una fenilalanina sostituisce una valina in posizione 617 [V617F]) in cellule ematopoietiche della maggior parte di pazienti affetti da policitemia vera ed in circa la metà dei pazienti con trombocitemia essenziale (Kaushansky, *Blood*

2005). Questa mutazione destabilizza la forma inattiva dell'enzima, causando una attivazione costitutiva di JAK e delle molecole a valle. Le cellule del midollo osseo di questi pazienti risultano ipersensibili ai fattori di crescita.

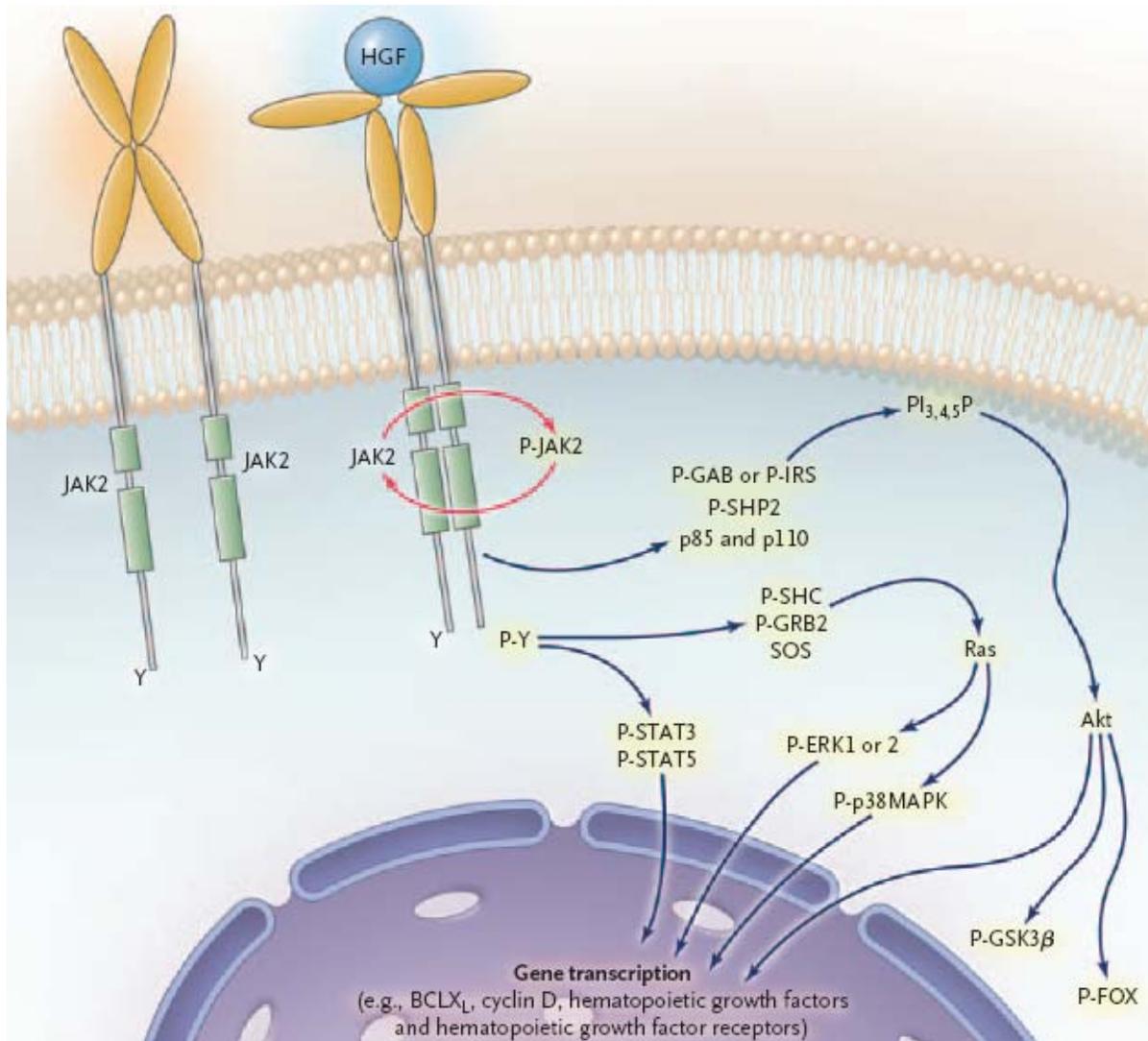
I domini citoplasmatici box1 e box2 costitutivamente legano le chinasi della famiglia JAK, anche in forma inattiva. In seguito al legame col ligando, la stretta giustapposizione delle due chinasi favorisce la loro attivazione reciproca, dando inizio ai segnali di trasduzione. La JAK chinasi attivata fosforila poi (a) un residuo tirosinico del recettore stesso; (b) molecole che promuovono la sopravvivenza e la replicazione cellulare, quali le STAT, PI3K, e le MAPK; e (c) molecole che regolano le vie di segnalazione, come le fosfatasi SHP1 e SHIP1 e SOCS (**Figure 5 e 8**).

Tutti e quattro i membri della famiglia (JAK1, JAK2, JAK3, e TYK2) presentano 3 domini principali, JH1 (JAK omologo 1), JH2, e FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin), il responsabile ultimo del legame al dominio citoplasmatico del recettore citochinico (**Figura 5**). JH1 è il dominio funzionale dell'attività chinasi delle JAK ed è attivo quando espresso da solo, mentre quando è associato con JH2 è fortemente inibito (Saharinen et al., *Mol Biol Cell* 2003). Per cui il dominio JH2 regola l'attività chinasi di JH1, interagendo con la conformazione inattiva del loop, e non con quella attiva, di attivazione di JH1 (Lindauer et al., *Protein Eng* 2001).



Adattata da Kaushansky, *J Clin Invest* 2005

Figura 5. Schema dell'architettura e della segnaletica iniziale del recettore per citochine ematopoietiche. Sono riportati schematicamente i motivi 1 o 2 del recettore citochinico (C, Cys; WS, Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser), il dominio transmembrana e la sequenza del box1 che lega la JAK chinasi. Sono indicati anche i 3 domini principali della JAK chinasi (FERM, che lega il box1; JH1, con azione chinasi; JH2, regolatore) In seguito all'attivazione di JAK, sono mostrati i siti di fosforilazione delle tirosine del recettore, che fungono da sito di legame per le STAT e le proteine adattatrici (SHC o SHP2).

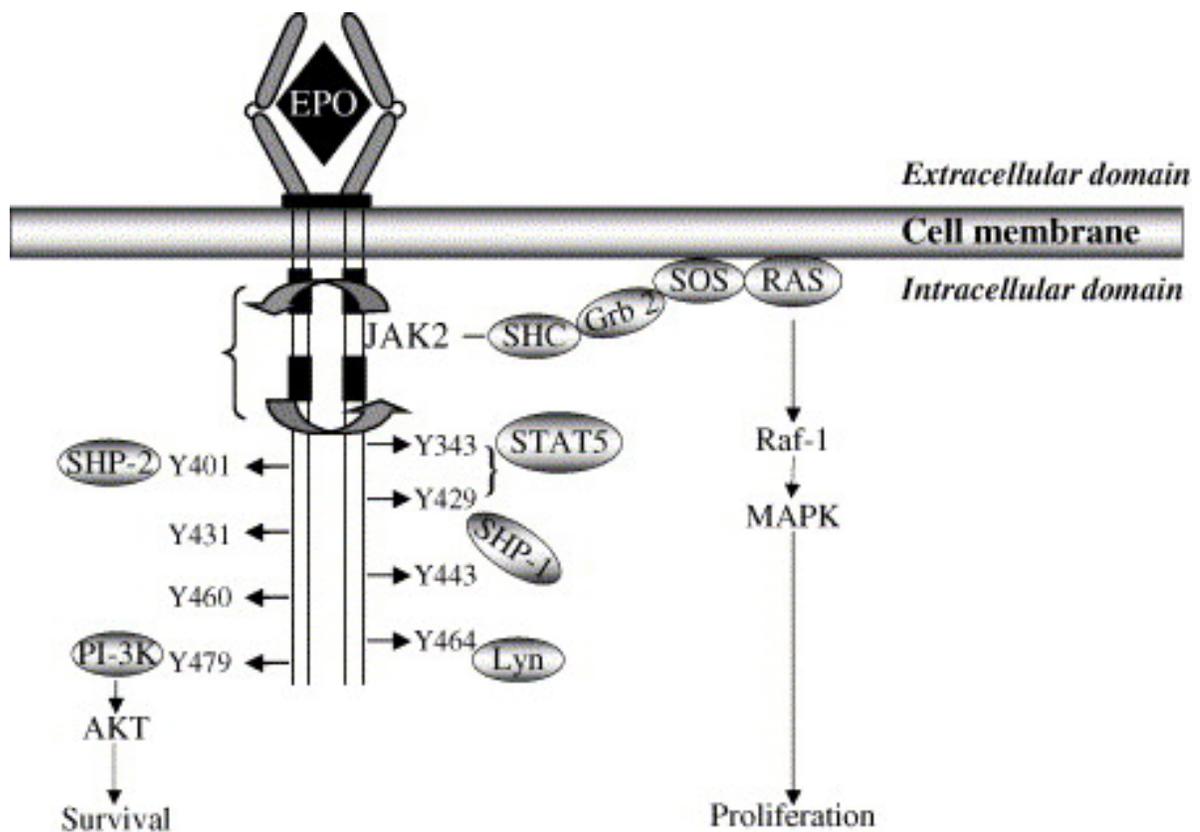


Adattata da Kaushansky, *N Engl J Med* 2006

Figura 6. Vie di segnale del recettore ematopoietico. Ciascun recettore per i fattori di crescita ematopoietici è composto da due subunità con uno o due motivi di 200 aa (ogni ovale rappresenta 100 aa), che legano due molecole di JAK2 e assumono una conformazione aperta (a sinistra), in assenza dello specifico fattore di crescita. Il legame del ligando modifica la conformazione del recettore, portando i domini citoplasmatici in stretta vicinanza, rendendo possibile la fosforilazione reciproca della due chinasi, che in tal modo si attivano. Uno dei primi substrati per JAK2 attivata sono i residui tirosinici del recettore (Y). Quando questi vengono fosforilati (P), possono legare proteine adattatrici – SHC, GRB2, GAB (Grb Binding), e IRS (Insulin-Receptor Substrate) –, fosfatasi (SHP2), attivatori delle proteine G (SOS), e chinasi lipidiche (p85 e p110 e PI3K). Altri effettori di questa segnaletica sono STAT3 e STAT5, i fosfolipidi di membrana ($PI_{3,4,5}P$), Ras, la chinasi AKT, MAPK, ERK 1 e 2, P-FOX e P-GSK3 β . Inoltre, numerosi segnali possono influenzare la trascrizione nucleare di molecole antiapoptotiche (es. Bcl-xL), regolatrici del ciclo cellulare (es. cicline) e ulteriori fattori di crescita e loro recettori.

Epo-R

Epo-R appartiene alla classe I della famiglia dei recettori per le citochine, e inizia la via di segnalazione mediante l'attivazione di JAK2, che si lega al dominio conservato box1 del recettore dimerico per EPO (Jiang et al., *J Biol Chem* 1996; Witthuhn et al., *Cell* 1993) (**Figura 7**). JAK2 attivata fosforila Epo-R in diversi residui tirosinici citoplasmatici, che favoriscono il reclutamento di proteine contenenti il dominio SH2 (**Figura 7**) e di proteine adattatrici, come STAT5a/b, SHP1, SHP2, SHIP, p85 α (sub-unità regolatrice di PI3K, Grb2, chinasi tirosinica Lyn e SOCS3 (Klingmuller, *Eur J Biochem* 1997; Wojchowski et al., *Exp Cell Res* 1999). Nonostante l'identificazione di numerose molecole che legano Epo-R, il ruolo fisiologico della cascata segnalativa coinvolta è ancora poco noto.



Adattata da Munugalavadla & Kapur, *Critical Rev Oncol Hematol* 2005

Figura 7. Schema delle vie di segnalazione attivate tramite Epo-R in risposta alla stimolazione con Epo.

L'attivazione di PI3K, Akt, e FKHRL1 è stata associata alla tirosina 479 di Epo-R (Uddin et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2000), mentre la tirosina 343 è stata descritta principalmente come attivatrice di STAT5 e coinvolta nell'indurre l'espressione di Bcl-xL (Pircher et al., *J Biol Chem* 2001; Socolovsky et al., *Cell* 1999), fattore con un ruolo fondamentale per la sopravvivenza e il differenziamento terminale di progenitori eritroidi (Motoyama et al., *J Exp Med* 1999). L'espressione di Bcl-xL indotta da EPO sembra dipendere dall'attivazione di STAT5 (Socolovsky et al., *Cell* 1999), anche se i dati ottenuti sino ad oggi sono ancora controversi. Anche il ruolo – nella proliferazione, sopravvivenza e/o differenziamento dei progenitori eritroidi – di vari residui tirosinici presenti nella porzione distale di Epo-R è ancora poco noto. Recenti studi sembrano suggerire che la metà distale di Epo-R possa regolare negativamente le funzioni di Epo-R (D'Andrea et al., *Mol Cell Biol* 1991). Infatti, è stato dimostrato che la regione distale di Epo-R lega proteine di segnale coinvolte nella regolazione negativa del recettore, compresa la fosfatasi ematopoietica specifica SHP-1 (Yi et al., *Blood* 1995). La perdita di SHP-1 provoca iperproliferazione di numerose filiere ematopoietiche in seguito all'attivazione del recettore (Shultz et al., *Cell* 1993) e forme troncate di Epo-R provocano una iper-attivazione di JAK2.

Il differenziamento indotto da EPO è dipendente dalla cooperazione delle vie di segnalazione di Src e PI3K (Kubota et al., *EMBO J* 2001). Sembra che la chinasi Src costituisca il sito di legame per la subunità p85 α . Src può legare direttamente i residui tirosinici fosforilati di Epo-R mediante il suo dominio SH2, in seguito a stimolazione con Epo.

Il meccanismo col quale Epo-R bilancia i segnali positivi e negativi in risposta ad EPO dipende in parte dalla sua capacità di fosforilare e defosforilare le tirosine del recettore. La fosforilazione delle tirosine in risposta ad EPO è transiente e ritorna a livelli basali entro 30 min dalla stimolazione, suggerendo che Epo-R viene defosforilato piuttosto velocemente da un controllo negativo (Dusanter-Fourt et al., *J Biol Chem* 1992; Linnekin et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; Miura et al., *Mol Cell Biol* 1991; Quelle & Wojchowski, *J Biol Chem* 1991). A questo riguardo, sembra che la fosfatasi SHP-1, che lega il dominio SH2 di Epo-R fosforilato (Klingmuller et al., *Cell* 1995), svolga un ruolo essenziale. SHP-1 si associa alla tirosina 429 di Epo-R, legame fondamentale per defosforilare ed JAK2. L'attivazione di SHP-1 mediata dal legame ad Epo-R svolge un ruolo fondamentale anche

nello spegnimento della segnaletica che induce proliferazione cellulare, come nel caso della policitemia vera (de la Chapelle et al., *Lancet* 1993).

Altri fattori di regolazione negativa appartengono alla famiglia di SOCS (Starr et al., *Nature* 1997). L'espressione genica di *SOCS* viene modulata rapidamente in risposta a diverse citochine e la famiglia di SOCS agisce mediante un loop di "feedback" negativo per annullare la traduzione della segnaletica indotta dalle citochine. SOCS-1 inibisce l'attivazione di JAK2 (Starr et al., *Nature* 1997; Endo et al., *Nature* 1997), mentre SOCS-3 inibisce la segnaletica indotta da EPO, associandosi con Epo-R e JAK2 (Sasaki et al., *J Biol Chem* 2000).

All'eritropoiesi sono stati associati tre geni SOCS (CIS, SOCS-1, SOCS-3). Il reclutamento di CIS al dominio SH2 di Epo-R inibisce la proliferazione cellulare. Topi *CIS*^{-/-} non mostrano un fenotipo eritroide (Marine et al., *Cell* 1999). Al contrario, topi *SOCS-1*^{-/-} presentano un'anemia moderata e la milza contiene numerose cellule eritroidi nucleate (Metcalf et al., *Leukemia* 1999). La delezione di *SOCS-3*, invece, risulta letale a livello embrionale per eritrocitosi ed un accumulo di cellule eritroidi nucleate nel fegato fetale (Marine et al., *Cell* 1999). Recenti studi hanno dimostrato che i geni *SOCS* possono essere regolati diversamente durante la maturazione eritroide (Sarna et al., *Oncogene* 2003). Infatti, l'espressione costitutiva di SOCS-1 e SOCS-3 interferisce col differenziamento dei progenitori eritroidi.

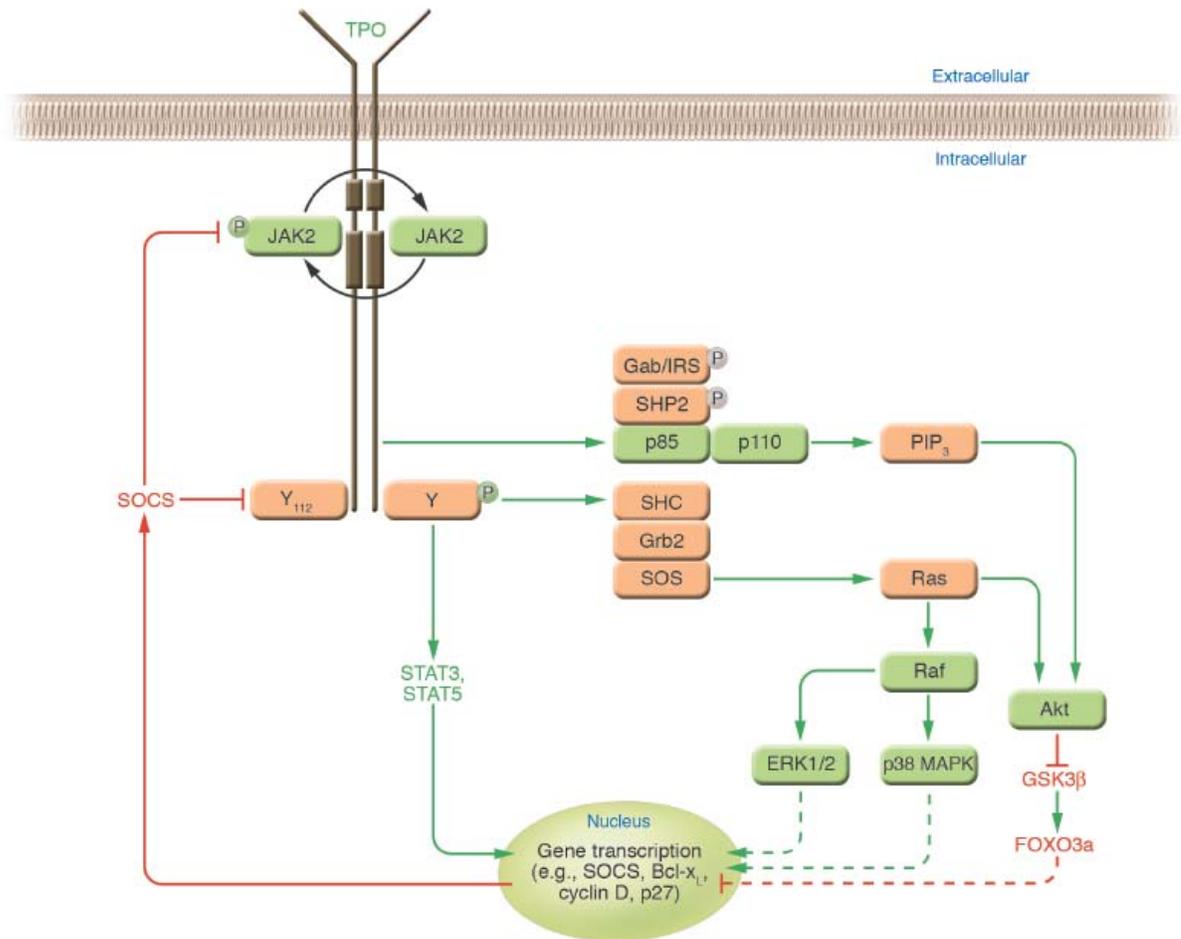
c-Mpl

Il c-Mpl è un membro della famiglia dei recettori di tipo I per i fattori di crescita. E' espresso primariamente in tessuti ematopoietici, specialmente in megacariociti, nei loro precursori e loro progenie. In questi tessuti, c-Mpl è espresso costitutivamente, anche se la sua espressione sembra essere modulata dal legame della TPO e dall'internalizzazione del recettore stesso. E' presente un secondo livello potenziale di regolazione di c-Mpl; infatti, sono state descritte numerose forme di "splicing" del recettore, che variano nella loro attività biologica, ed una forma particolare può alterare il catabolismo del recettore. Anche se la proporzione delle varie isoforme del recettore differisce in tessuti diversi, non è ancora stato dimostrato un loro effetto regolatore.

Il gene *c-Mpl* contiene 12 esoni ed è organizzato come gli altri membri della famiglia dei recettori per le citochine (Alexander & Dunn, *Oncogene* 1995). Un sito promotore della trascrizione di *c-Mpl* è posto 13 residui nucleotidici a monte del codone di inizio della traduzione, e sebbene il promotore sia privo dei motivi convenzionali TATA e CAAT, la sequenza adiacente al 5' contiene la sequenza consenso per il legame dei fattori di trascrizione Ets e GATA, proteine fondamentali per la regolazione di numerosi geni specifici dei megacariociti. L'analisi dei trascritti di *c-Mpl* ha portato ad identificare numerose forme di "splicing" alternativo, che comprendono delezioni del dominio extra-cellulare (Li et al., *Cytokine* 2000), un'alternativa del dominio intra-cellulare (isoforma K; Wendling et al., *Virology* 1986), ed una isoforma troncata prematuramente contenente un'unica terminazione carbossilica (isoforma c-Mpl-tr; Coers et al., *J Biol Chem* 2004). L'isoforma K, sebbene agisca potenzialmente come una forma dominante negativa del recettore, non interferisce con la segnalazione di TPO e non interagisce con la forma normale del recettore (Millot et al., *Exp Hematol* 2002). Al contrario, c-Mpl-tr può avere un ruolo fisiologico, essendo l'unica isoforma espressa sia nell'uomo che nel topo. È importante notare che i livelli di espressione di c-Mpl sono bassi, con solo 25–100 molecole di recettore espresse sulla superficie di ogni piastrina (Broudy et al., *Blood* 1997). Il motivo della scarsa espressione di c-Mpl sembra essere correlato con l'isoforma c-Mpl-tr, poiché la sua co-espressione con c-Mpl porta ad una rapida degradazione di quest'ultimo (Coers et al., *J Biol Chem* 2004). Questo meccanismo, comunque, sebbene avvalorato dalla regolazione della segnalazione di TPO, al momento è semplicemente speculativo.

Un altro aspetto della regolazione di c-Mpl è la sua espressione su cellule ematopoietiche di pazienti con patologie mieloproliferative. Mentre su megacariociti e piastrine da midollo normale il recettore è facilmente rilevabile, su cellule da pazienti affetti da policitemia vera ed altre patologie mieloproliferative è estremamente ridotto (Moliterno et al., *N Engl J Med* 1998; Yoon et al., *Eur J Haematol* 2000). Le basi molecolari non sono ancora note e potrebbero essere correlate all'ipersensibilità alle citochine e alle modificazioni della segnalazione riscontrate in queste patologie. Inoltre, la co-espressione di JAK2 è essenziale per l'espressione di c-Mpl (Huang et al., *Mol Cell* 2001), e l'attività di questa chinasi è sostanzialmente alterata in numerosi pazienti con patologie mieloproliferative.

Quando c-Mpl viene attivato dal legame di TPO, i suoi effetti su HSC, megacariociti e piastrine sono mediati da una serie di eventi biochimici. TPO attiva sia JAK2 che TYK2 in linee cellulari che esprimono c-Mpl, sebbene solo JAK2 sia essenziale per la segnalazione e sia l'isoforma attivata predominante nei megacariociti primari (Drachman et al., *J Biol Chem* 1999). I megacariociti ed i loro precursori sono stimolati da TPO mediante la formazione di un complesso costituito dalla fosfatasi SHP2, dalla proteina di supporto Gab/IRS, e dalla subunità regolatrice p85 di PI3K, che porta all'attivazione di PI3K e del suo effettore a valle, Akt (**Figura 8**) (Bouscary et al., *Oncogene* 2001). Il blocco di questo sistema di segnale induce l'inibizione della sopravvivenza e della proliferazione cellulare indotta da TPO (Geddis et al., *J Biol Chem* 2001). In piastrine mature, TPO favorisce la secrezione dei granuli α e l'aggregazione indotta da trombina mediante l'attivazione di PI3K (Kojima et al., *Exp Hematol* 2001). Attualmente si sta studiando la segnalazione a valle di Akt nei megacariociti e nelle piastrine, con particolare attenzione al fattore di trascrizione FOXO3a, all'inibitore del ciclo cellulare p27, ed a GSK3 β . Oltre a PI3K, TPO stimola due vie di segnalazione della MAPK (**Figura 8**), p42/p44 ERK1 e ERK2 (Drachman et al., *Blood* 1997) e p38 MAPK (Kirito et al., *Blood* 2003), eventi mediati dalla fosforilazione del recettore, dal legame e fosforilazione di Grb2, SHC, e SOS, e dallo scambio di GDP con GTP su Ras (Rojnuckarin et al., *J Biol Chem* 2001). La conseguenza funzionale di questi eventi comprende l'induzione del fattore di trascrizione HoxB4 e l'espansione di HSCs mediata da p38 MAPK (Kirito et al., *Blood* 2003); la traslocazione del fattore di trascrizione HoxA9 dal citoplasma al nucleo, che contribuisce all'espansione di HSCs (Kirito et al., *Mol Cell Biol* 2004); la proliferazione e poliploidizzazione dei megacariociti indotte da ERK1/2 (Rojnuckarin et al., *Blood* 1999); e l'aumento del rilascio della fosfolipasi A₂ indotta da trombina con conseguente attivazione piastrinica (van Willigen et al., *Thromb Haemost* 2000).



Adattata da Kaushansky, *J Clin Invest* 2005

Figura 8. Schema delle vie di segnalazione attivate da TPO. c-Mpl è stato schematizzato in forma attivata (fosforilata). Una volta fosforilata, la Tyr112 serve come sito di legame per STAT3 e STAT5, entrambe attivati da TPO, che inducono la produzione di Bcl-xL. Lo stesso sito può reclutare SHC, che a sua volta lega Grb2 e SOS, scambiando GTP per GDP, e attivando Ras. In successione, una MAPKKK (MAPK kinase kinase, es. Raf), una MAPKK (MAPK kinase), e la MAPK ERK1/2 o p38 MAPK vengono attivate. Come mostrato, l'attivazione di Raf contribuisce all'attivazione di PI3K. In un sito vicino alla Tyr112, in seguito alla fosforilazione da parte di JAK2, si forma un complesso contenente la fosfatasi SHP2, la proteina adattatrice Gab1, e la subunità regolatrice di PI3K (p85), che recluta la subunità chinasi di (p110), e fosforila PIP2, legato alla membrana, generando PIP3. PIP3 poi lega proteine contenenti il dominio di omologia con la plestrina, come Akt. In seguito Akt fosforila (ed inattiva) GSK3β, che promuove la proliferazione cellulare. Akt fosforila anche il fattore di trascrizione FOXO3a, inibendo la sua induzione dell'inibitore del ciclo cellulare p27. L'inibizione della segnalazione cellulare può avvenire anche direttamente a livello di JAK attivato; in rosso è riportata la regolazione della trascrizione delle proteine SOCS da parte delle STAT, e il loro conseguente blocco della segnalazione dovuto alla preclusione del legame delle proteine di segnale ai residui P-Tyr del recettore o alla loro fosforilazione indotta da JAK.

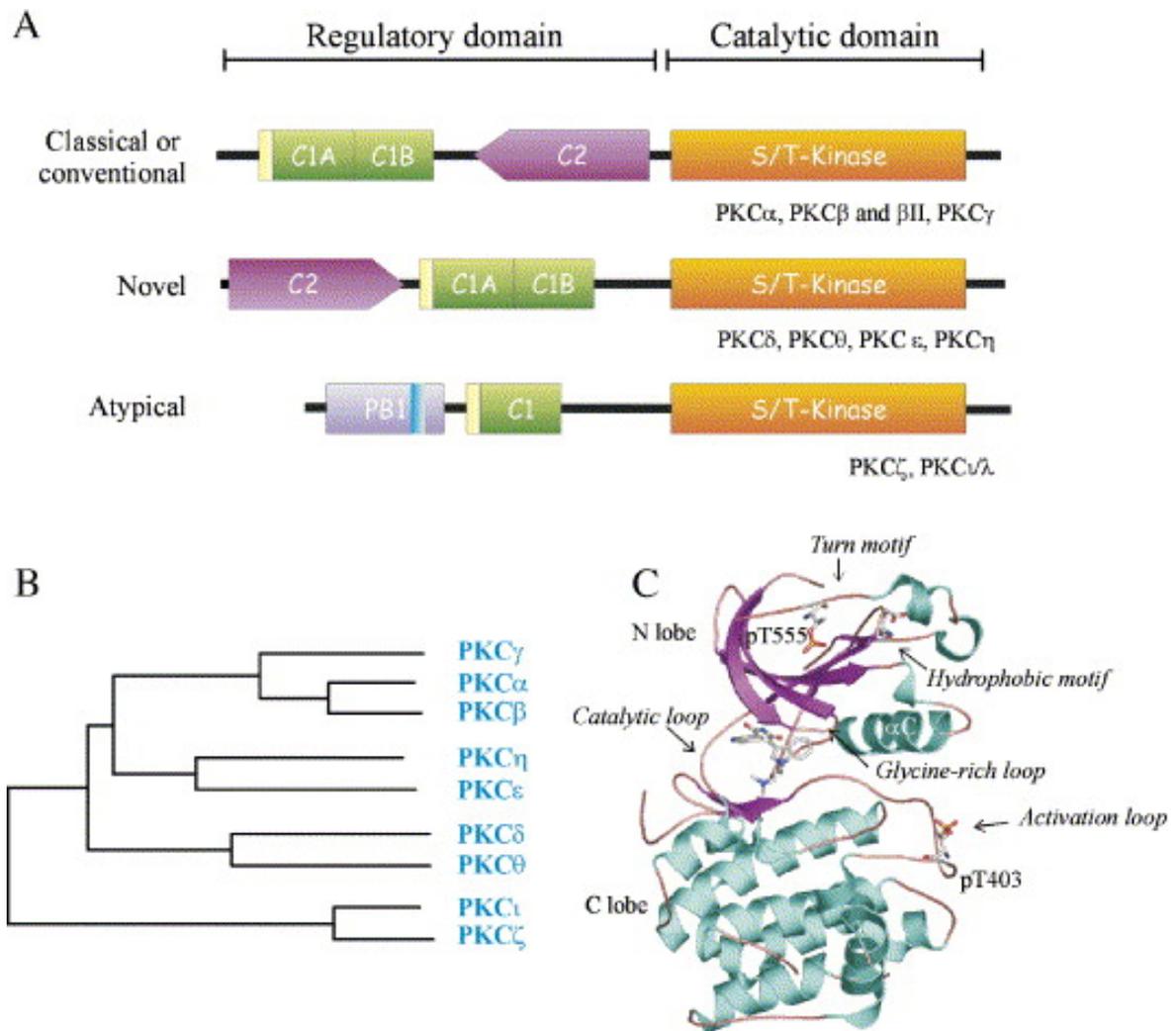
Famiglia PKC

Nei mammiferi la famiglia delle PKC comprende 10 membri codificati da 9 geni. Ciascun isotipo di PKC è espresso in un'ampia varietà di tipi cellulari e numerosi isotipi sono co-espressi nella stessa cellula, rendendo la famiglia costituita da enzimi ubiquitari (Mellor & Parker, *Biochem J* 1998). Tutte le PKC contengono un dominio chinasi C-terminale ed un dominio regolatorio N-terminale (**Figura 9 A**). In base alla struttura primaria ed alle caratteristiche biochimiche, gli enzimi possono essere suddivisi in tre sottofamiglie: PKC *classiche o convenzionali* (α , β I, β II e γ ; cPKC), PKC *nuove* (δ , θ , ϵ e η ; nPKC), e PKC *atipiche* (ζ e λ (topo)/ ι (uomo); aPKC). La porzione regolatrice delle convenzionali e delle nuove PKC contiene un doppio dominio C1 (C1A e C1B) e un dominio C2 (**Figura 9 A**). Nel caso delle cPKC, il dominio C2 segue il dominio C1, rendendo questi isoenzimi dipendenti da Ca^{2+} e diacilglicerolo (DAG), mentre nelle nPKC il dominio C2 precede il dominio C1 nella sequenza primaria. Questi domini C2 non sono sensibili a Ca^{2+} , rendendo questi enzimi dipendenti da DAG, ma indipendenti da Ca^{2+} (Ohno & Nishizuka, *J Biochem* 2002). Le aPKC sono prive del dominio C2 e contengono un solo dominio C1, che non è sensibile al DAG. Invece, le aPKC contengono un dominio PB1 in posizione N-terminale, che si estende per circa 85 aa e si lega ad altri domini PB1 comprendendo, attraverso l'interazione PB1–PB1, proteine come ZIP/p62, Par6 o MAPK5 (Ponting et al., *Trends Biochem Sci* 2002; Moscat et al., *Cell Death Differ* 2006). Il dominio PB1 è ulteriormente classificato in due tipi, tipo I e tipo II. Il complesso mediato da PB1 viene formato attraverso l'interazione tra i domini di tipo I e di tipo II. Il PB1 di tipo I adotta il motivo OPCA, come sito di legame, che consiste di una sequenza consenso di 28 aa con residui acidi ed idrofobici conservati (**Figura 9 A**). D'altra parte, PB1 di tipo II richiede un residuo di lisina conservato a livello di un suo foglietto β (β 1) (Hirano et al., *J Biol Chem* 2004).

Il dominio catalitico delle PKC contiene i siti di legame per ATP e di consenso per la fosforilazione, interagisce con i substrati ed è il responsabile dell'attività di trasferimento della fosforilazione. I domini chinasi degli isoenzimi sono strettamente correlati, come illustrato dal dendrogramma (**Figura 9 B**), e questi enzimi costituiscono una porzione della super-famiglia delle chinasi AGC. La struttura del ripiegamento delle chinasi è suddivisa in due sotto-domini o lobi. Il lobo N-terminale più piccolo (lobo N) è composto da 5 foglietti

β ed una principale α elica, chiamata elica αC . Il lobo più ampio è detto lobo C ed è costituito prevalentemente da un'elica (**Figura 9 C**) (Huse & Kuriyan, *Cell* 2002). E' importante notare che tutti gli isoenzimi PKC aumentano la loro attività catalitica in seguito a due o tre eventi sequenziali di fosforilazione del dominio catalitico in siti conservati in tutti i membri della famiglia.

Le isoforme di PKC sono coinvolte in eventi di trasduzione del segnale di numerose vie di segnaletica fondamentale, che comprendono la proliferazione cellulare (Oka & Kikkawa, *Cancer Metastasis Rev* 2005), il differenziamento (Denning, *Int J Biochem Cell Biol* 2004), l'apoptosi (Martelli et al., *Eur J Histochem* 2004), l'adesione (Kitajima et al., *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999), la migrazione (Jiang et al., *Clin Exp Metastasis* 2005), la secrezione di ioni (Del et al., *Am J Physiol, Cell Physiol* 2005) e la funzione barriera (Farhadi et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2006). Data la loro ubiquità, gli isoenzimi PKC sono stati considerati dei bersagli per agenti terapeutici (Goekjian & Jirousek, *Expert Opin Investig Drugs* 2001), per cui sono stati sviluppati numerosi inibitori ed attivatori selettivi delle PKC.



Adattata da Corbalán-García & Gómez-Fernández, *Biochim Biophys Acta* 2006

Figura 9. (A) Schema della struttura primaria, con la composizione dei domini, dei membri della famiglia delle proteine chinasi C. Il dominio regolatorio è localizzato nella regione N-terminale, ed è composto da vari domini a seconda dell'isoenzima. Pseudosubstrato (giallo); dominio C1 (verde); dominio C2 (porpora). Concordemente con l'orientamento degli otto foglietti β che formano il dominio, le cPKC presentano un dominio C2 di tipo I con la freccia verso sinistra, e le nPKC presentano un dominio C2 di tipo II con la freccia rivolta verso destra. Il dominio PB1 (violetto) contiene il motivo OPCA (blu). Tutte le chinasi hanno un core conservato (arancione) che contiene i siti per il legame di ATP, del substrato e per il trasferimento del fosfato. Questa famiglia di chinasi può essere suddivisa in 3 sottofamiglie in base alla struttura primaria ed alle proprietà biochimiche. Le cPKC sono regolate da Ca^{2+} , fosfatidilserina e DAG. Le nPKC sono regolate da DAG e fosfolipidi acidi, indipendentemente da Ca^{2+} . Le aPKC sono regolate da fosfolipidi acidi, ceramide e interazioni proteina-proteina. (B) Dendrogramma della famiglia delle proteine chinasi C, che costituiscono una porzione della superfamiglia delle chinasi AGC. (C) Struttura completa del dominio catalitico di PKC ϵ complessata con l'inibitore specifico. La porzione N-terminale è rappresentata in porpora e quella C-terminale in blu.

Dominio C1

Gli isoenzimi PKC convenzionali e nuovi migrano verso le membrane in risposta all'aumento dei livelli di DAG. L'attivazione delle PKC è prodotta dal legame diretto di questo ligando ad un motivo noto come dominio di omologia 1 delle protein chinasi C (C1) (Hurley et al., *Protein Sci* 1997). Questo dominio presenta anche un'alta affinità per gli esteri del forbolo, che mimano naturalmente il DAG ed hanno attività di induzione tumorale (Castagna et al., *J Biol Chem* 1982). Questa regione si estende per 50–51 aa e si presenta ripetuta in tandem sia nelle cPKC che nelle nPKC, dove il dominio completo C1 viene suddiviso nei sottodomini C1A e C1B (Hurley et al., *Protein Sci* 1997) (**Figura 9 A**). Le aPKC presentano un solo dominio C1 che non lega DAG o gli esteri del forbolo, ma interagisce con ceramide (Wang et al., *J Biol Chem* 2005).

Il dominio C1 è stato strutturalmente definito come un membro della superfamiglia dei domini ricchi in cisteina (Cys₂). In generale, i domini C1 possono essere classificati come *tipici* e *atipici*, in base alla loro capacità, o perdita della stessa, di legare DAG/esteri del forbolo (Hurley et al., *Protein Sci* 1997). Numerose proteine non correlate con le PKC contengono il dominio C1 tipico, come per esempio PKD (PKC μ nel topo) (Valverde et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994), o atipico, come Raf (Ghosh et al., *J Biol Chem* 1994) e la chinasi Rho (Narumiya et al., *FEBS Lett* 1997).

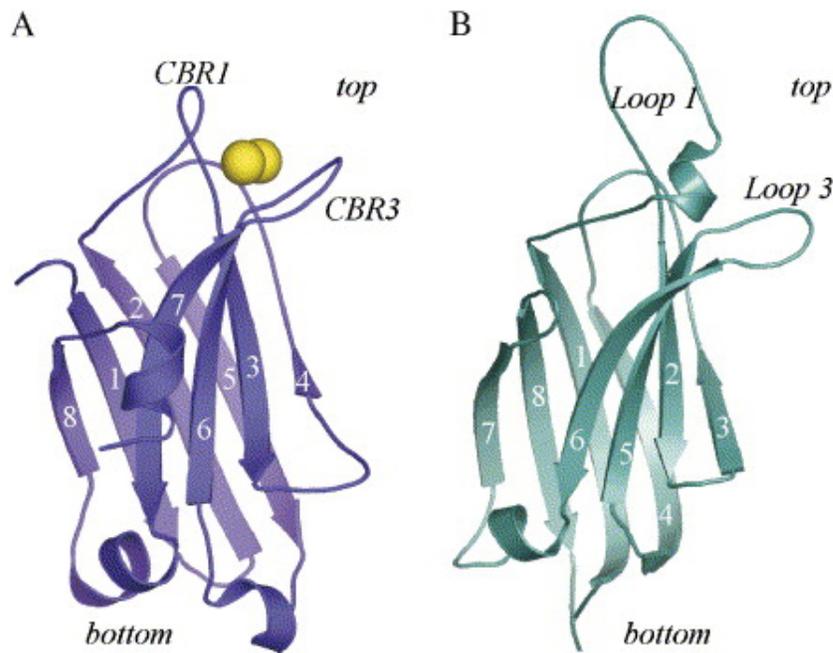
E' noto che il DAG induce una variazione delle proprietà fisiche delle membrane, che facilitano l'attivazione delle PKC (Gomez-Fernandez et al., *Mol Membr Biol* 2004). Sebbene il DAG sia presente nelle cellule in basse concentrazioni può essere generato, in seguito a stimolazione, mediante l'intervento delle fosfolipasi C (PLC) e D (PLD).

L'effetto prodotto dal DAG sull'attivazione delle PKC dipende anche dalla sua azione sulle membrane, che essenzialmente consiste in: (i) separazione delle teste polari, che può facilitare l'inserzione nella porzione apolare (Slater et al., *J Biol Chem* 1994); e (ii) disidratazione della superficie della membrana che lega la porzione polare del DAG (Lopez-Garcia et al., *Biochim Biophys Acta* 1994). Inoltre, lo stato fluido delle membrane è essenziale per l'attivazione delle PKC.

Dominio C2

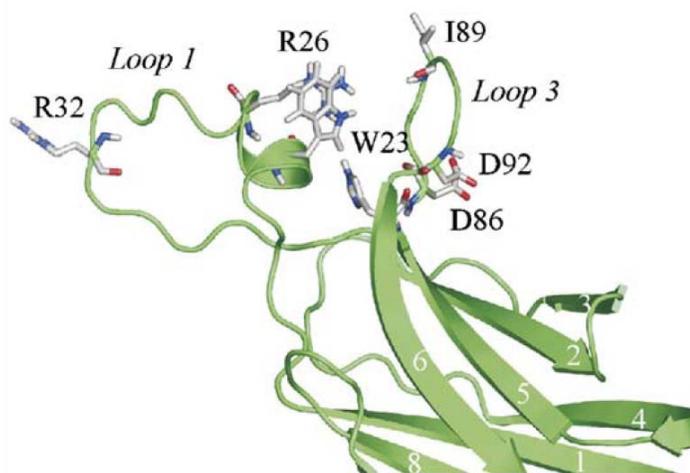
Il dominio C2 consiste in 130 aa ed è strutturalmente definito come un membro della superfamiglia di domini che legano Ca^{2+} /lipidi (CaLB). La superfamiglia comprende due famiglie: (i) la famiglia S, o di tipo I, della quale fa parte il dominio C2 delle cPKC; e (ii) la famiglia P, o di tipo II, che include quello delle nPKC. Proteine non correlate con PKC possono contenere uno di questi domini, come per esempio PLC (Rebecchi & Pentylala, *Physiol Rev* 2000) e PLA2 (Balsinde & Balboa, *Cell Signal* 2005) che contengono un dominio di tipo II. Questi due tipi di domini C2 hanno struttura simile, ma differiscono nell'orientamento degli otto foglietti- β che li costituiscono (**Figura 10**).

Il primo foglietto del dominio C2 delle cPKC (tipo I) occupa la stessa posizione strutturale dell'ottavo foglietto delle nPKC (tipo II). In questo modo, le porzioni N- e C-terminali sono poste in alto nel tipo I ed in basso nel tipo II. Sebbene la ragione di queste due tipologie di dominio non siano ancora note, sembra che entrambe derivino da un progenitore comune (Jimenez et al., *J Mol Biol* 2003). La maggiore variabilità è posta a livello della regione N-terminale e nelle connessioni dei foglietti. Nelle cPKC, le tre connessioni che si trovano nella porzione superiore, dette *regioni che legano il Ca^{2+}* (CBR), contengono tutti i residui coinvolti nel legame del Ca^{2+} . CBR1 corrisponde alle connessioni $\beta 2-\beta 3$ e $\beta 1-\beta 2$ (dette *loop 1*), rispettivamente nelle cPKC e nelle nPKC. Questa regione è altamente conservata nelle cPKC, ma presenta differenze significative negli isoenzimi delle nPKC. Infatti, il dominio C2 di PKC ϵ e η presenta il loop più lungo descritto nella connessione tra i foglietti $\beta 1$ e $\beta 2$ (Ochoa et al., *J Mol Biol* 2001). Questo loop si proietta al di fuori della struttura e contiene una α -elica, che è assente in PKC δ e θ (**Figure 10 e 11**) (Pappa et al., *Structure* 1998).



Adattata da Corbalán-García & Gómez-Fernández, *Biochim Biophys Acta* 2006

Figura 10. Modello delle strutture del dominio C2 di PKC α (A) e PKC ϵ (B), rispettivamente esempi di dominio di tipo I e di tipo II. Le due diverse tipologie sono dovute al diverso orientamento dei foglietti- β che lasciano entrambe le porzioni N- e C-terminale rispettivamente all'apice o alla base. L'area di interazione con la membrana (CBR1-3 nella tipologia I, e loop 1-3 nel tipo II) si trova all'apice di ciascun dominio, indipendentemente dalla tipologia.



Adattata da Corbalán-García & Gómez-Fernández, *Biochim Biophys Acta* 2006

Figura 11. Modello dei residui del dominio C2 di PKC ϵ coinvolti nel legame dei lipidi. E' rappresentata la struttura 3D di PKC ϵ . I residui importanti per il legame dei fosfolipidi sono stati rappresentati con C in grigio, N in blu e O in rosso (Trp23, Arg26 e Arg32 nel loop1 e Ile89 nel loop 3). Inoltre sono stati riportati due residui che non intervengono nel legame dei lipidi: Asp86 e Asp92. Questi, posti sulla superficie della molecola, sono diretti in senso opposto rispetto ai residui che legano i fosfolipidi.

La struttura CBR3 è altamente conservata all'interno dello stesso gruppo di isoenzimi e corrisponde alle connessioni β_6 – β_7 e β_5 – β_6 (dette *loop 3*) delle rispettive cPKC e nPKC. Nelle nPKC è presente a questo livello una α -elica con una sequenza prevalentemente basica nella PKC δ , che è assente nella PKC ϵ . Inoltre, la tasca localizzata tra i loop 1 e 3 nella PKC ϵ si differenzia da quella delle cPKC in quanto tre dei cinque residui di asparagina conservati in queste ultime (Asp187, Asp246 e Asp248) sono sostituiti rispettivamente da Phe36, His85 e Ala87 (**Figura 11**).

Sebbene PKC ϵ sia compresa nelle nPKC, il suo dominio C2 ha un “core” con una struttura omologa a quella delle PKC α e β (**Figura 10**) (Ochoa et al., *J Mol Biol* 2001). Le differenze descritte fanno supporre che per le nPKC si possano considerare due sottoclassi, una rappresentata da PKC ϵ e η , e l'altra da PKC δ e θ (**Figura 9 B**).

PKC ϵ

PKC ϵ non presenta una specificità particolare per la fosfatidilserina sia in presenza che in assenza di DAG, e la carica negativa dei fosfolipidi è il principale fattore che regola questo tipo di interazioni (Medkova & Cho, *Biochemistry* 1998). Inoltre, PKC ϵ ha una capacità inferiore, rispetto a PKC α , di penetrare in membrane che contengono fosfatidilserina/DAG (Medkova & Cho, *Biochemistry* 1998). Studi effettuati sul modello della struttura di PKC ϵ hanno suggerito che i loop 1 e 3 possano partecipare nel legame delle membrane anioniche (Ochoa et al., *J Mol Biol* 2001). I residui Trp23, Arg26 e Arg32 (localizzati nel loop 1) e Ile89 (nel loop 3) sono fondamentali per l'interazione del dominio C2 con i fosfolipidi acidi delle membrane (**Figura 11**) (Corbalan-Garcia et al., *Biochemistry* 2003). E' stato dimostrato che il suo meccanismo di legame alla membrana differisce da quello delle cPKC, in quanto è priva dei residui appropriati per formare il sito di legame del Ca^{2+} e presenta una maggiore affinità per le membrane con acido fosfatidico che per quelle contenenti fosfatidilserina (Corbalan-Garcia et al., *Biochemistry* 2003).

Mediante l'utilizzo di inibitori specifici per le famiglie delle PLD e PLC è stato suggerito che per la localizzazione di membrana e l'attivazione di PKC ϵ siano essenziali sia l'acido fosfatidico che il DAG (Lopez-Andreo et al., *Mol Biol Cell* 2003), dimostrando che sia i domini C2 che C1 cooperano per la funzionalità dell'enzima. Inoltre, basse concentrazioni di acido fosfatidico e DAG sinergizzano per indurre la traslocazione

dell'enzima dal citoplasma alla membrana plasmatica (Lopez-Andreo et al., *Mol Biol Cell* 2003), per cui il legame di PKC ϵ alla membrana richiede la presenza sia del dominio C2 che C1. Quando nella cellula sono presenti concentrazioni fisiologiche di acido fosfatidico e di DAG, il dominio C2 permette la localizzazione di PKC ϵ in una porzione specifica della membrana plasmatica, ed immediatamente il dominio C1 permette un ancoraggio stabile (Lopez-Andreo et al., *Mol Biol Cell* 2003).

E' possibile che i numerosi ruoli identificati per PKC ϵ siano dovuti alle proprietà multifunzionali di questo enzima, ma attualmente rimane una questione importante e non risolta la precisa organizzazione e regolazione di tutti questi eventi.

Gli esteri del forbolo inducono il differenziamento MK e la traslocazione delle isoforme α , ϵ e θ di PKC dal citoplasma alla membrana cellulare (Ballen et al., *Exp Hematol* 1996). La PKC ϵ è espressa sia dagli eritroblasti che dai MK, sebbene a diversi livelli (Oshevski et al., *Biochem Biophys Res Commun* 1999). Goldfarb e collaboratori hanno dimostrato che PKC ϵ partecipa in particolare nel differenziamento MK attraverso la cooperazione funzionale di GATA-1 per l'attivazione dei promotori megacariocitari, e che la down-regolazione di PKC ϵ e MAPK inibisce il differenziamento MK nella linea cellulare K562 (Goldfarb et al., *J Biol Chem* 2001).

Famiglia TNF

Il TNF è un membro di un'importante famiglia di citochine che agiscono da mediatori del sistema immunitario e della risposta infiammatoria. E' stato infatti dimostrato il suo coinvolgimento nello shock settico, in patologie autoimmuni e in reazioni immunitarie legate al rigetto di trapianto (Wiley et al., *Immunity* 1995).

Oggi sono conosciuti almeno altri otto membri della stessa famiglia: LT α , TNF β , LT β , i ligandi di CD40, CD30, CD27, OX40, 4-1BB, FasL e TRAIL.

Tutti i ligandi, con un'unica eccezione, sono proteine di membrana di tipo II con un'omologia di circa 150 residui nella regione C-terminale extracellulare ed un dominio N-terminale citoplasmatico non conservato. Tale eccezione, LT α , sembra essere una proteina secretoria che può anche essere presente sulla superficie cellulare mediante l'interazione

con un altro membro della famiglia di TNF, $LT\beta$. Sono state inoltre identificate le forme solubili di TNF, di Fas e di TRAIL, derivanti da taglio proteolitico del dominio C-terminale.

Alcuni dei geni codificanti per i membri di tale famiglia sono riuniti in “clusters” nel genoma. In particolare TNF, $LT\alpha$ e $LT\beta$ sono strettamente collegati sul cromosoma 6 mentre il ligando di CD27 e di 1-4BB sono entrambi localizzati sul cromosoma 19p13.3. Al contrario TRAIL non è localizzato vicino a nessun membro conosciuto della famiglia di TNF, ma si trova sul cromosoma 3 alla posizione 3q26 (Wiley et al., *Immunity* 1995).

In generale la principale funzione di TNF è quella di favorire il reclutamento di neutrofili e monociti nei focolai di infiammazione, attivandone le funzioni microbicide. Il TNF induce quindi l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali e stimola i macrofagi e le cellule endoteliali a secernere chemochine, citochine in grado di stimolare la migrazione e il reclutamento dei leucociti. Oltre al ruolo svolto nell'ambito dell'infiammazione, TNF è coinvolto nella risposta immunitaria promuovendo la proliferazione dei linfociti T e B ed aumentando l'attività citotossica di cellule NK e linfociti T. TNF può anche indurre apoptosi in alcuni tipi cellulari attivando la via delle caspasi.

Bisogna infine ricordare che nel corso di infezioni molto gravi il TNF viene prodotto in quantità elevate e provoca alterazioni anatomo-patologiche e cliniche sistemiche quali febbre agendo sull'ipotalamo, sintesi di proteine di fase acuta da parte del fegato, cachessia, riduzione della contrattilità cardiaca e vascolare con conseguente collasso cardio-circolatorio, trombosi intra-vascolare e gravi disturbi metabolici quali ipoglicemia.

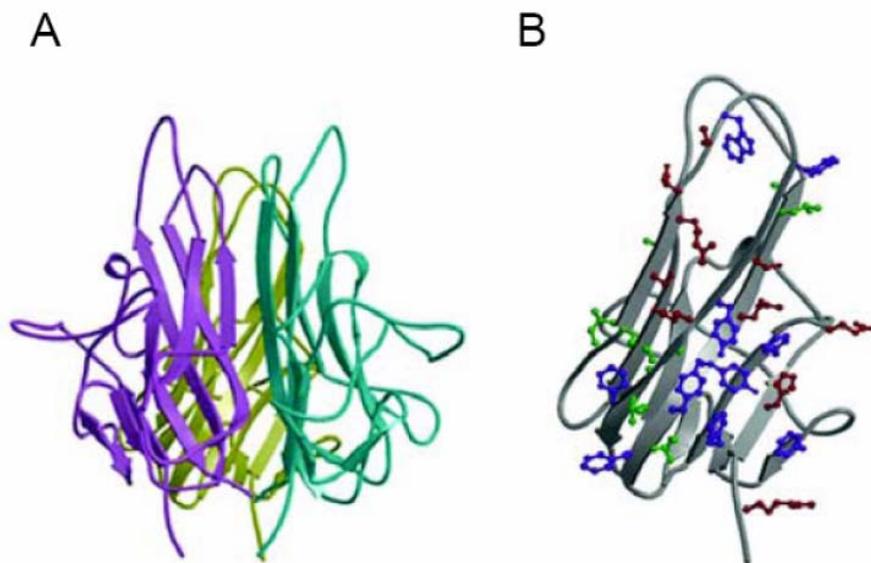
TRAIL

Il ligando Apo2L o TRAIL è uno dei membri della superfamiglia del TNF in grado di indurre apoptosi attraverso l'interazione con recettori proapoptotici (LeBlanc & Ashkenazi, *Cell Death Differ* 2003).

Questa proteina consiste in una sequenza amminoacidica di 281 aa nella forma umana e 291 aa nella forma murina (le quali condividono un grado di omologia del 65%), ed ha un peso molecolare pari a 32.5 kDa.

TRAIL è una proteina di membrana di tipo II caratterizzata da un dominio transmembrana, un dominio C-terminale extracellulare ricco di cisteine conservato tra i membri della stessa famiglia, e un dominio N-terminale citoplasmatico che presenta invece delle caratteristiche uniche. Il dominio C-terminale di TRAIL è caratterizzato infatti da un grado di omologia con i membri più stretti della famiglia del TNF come FasL, TNF α , LT α e LT β del 28%, 23%, 23% e 22% rispettivamente, dove in particolare l'omologia è legata alla regione che presumibilmente forma un foglietto- β .

Tuttavia TRAIL non è solo presente in forma di molecola di superficie, ma può anche essere rilasciato in seguito a proteolisi ad opera di proteasi cisteiniche. Il dominio extracellulare (ammino acidi 114-281) infatti, così come è stato osservato per FasL e per il TNF- α , in seguito a taglio proteolitico forma una struttura omotrimerica solubile necessaria per creare legami crociati con i propri recettori e quindi trasdurre il segnale alle cellule bersaglio (Wiley et al., *Immunity* 1995; Pitti et al., *J Biol Chem* 1996). La stabilità e l'attività biologica di TRAIL sono mantenute da uno ione zinco che stabilizza la forma trimerica legandosi ai residui cisteinici (**Figura 12**).



Adattata da Kimberley & Screaton, *Cell Res* 2004

Figura 12. Struttura cristallina di TRAIL (A) Struttura del trimero di TRAIL, ogni monomero è rappresentato in un colore diverso. (B) Struttura di ciascun monomero di TRAIL con particolare attenzione ai residui coinvolti nella sua trimerizzazione: gli anelli aromatici sono evidenziati in viola, i residui idrofobici in verde e i residui polari in rosso.

Una delle differenze tra FasL e TRAIL consiste nella diversa distribuzione tissutale dei loro trascritti. Nel caso di FasL infatti è possibile evidenziarne la presenza limitatamente alle cellule T attivate mentre livelli significativi di TRAIL sono stati rilevati in molti tessuti tra cui milza, prostata e polmone. Inoltre la vasta distribuzione degli mRNA di TRAIL riscontrata nei tessuti normali suggerisce che l'attività di TRAIL debba essere strettamente regolata. A proposito dei sistemi immunitario ed ematopoietico, la presenza di TRAIL è stata dimostrata sulla superficie di linfociti T e B attivati, così come in cellule mononucleate purificate da campioni di midollo osseo. In relazione al contesto vascolare è stato dimostrato che TRAIL è espresso nella parete dell'arteria polmonare e dell'aorta. A tal riguardo è interessante notare che, mentre il clivaggio di FasL dalla superficie cellulare richiede l'attivazione di metalloproteasi zinco-dipendenti, il rilascio di TRAIL solubile richiede l'azione di cistein proteasi e la parete dei vasi è una ricca fonte di queste proteine (Zauli et al., *Circ Res* 2003).

Le funzioni di TRAIL

Studi funzionali hanno mostrato che questo ligando ha una forte capacità di indurre apoptosi in un vasto numero di linee cellulari tumorali sia *in vivo* che *in vitro*, ma mostra una minima tossicità per tessuti e cellule normali, sottolineando quindi la sua potenziale utilizzazione terapeutica nel trattamento dei tumori (Wang & El-Deiry, *Oncogene* 2003; Jo et al., *Nat Med* 2000).

Studi di silenziamento genico effettuati su topi hanno inoltre evidenziato che TRAIL svolge un importante ruolo nella sorveglianza immunitaria contro lo sviluppo di tumori e contro cellule infettate da virus; infatti l'espressione di TRAIL e dei suoi recettori può incrementare la citotossicità antivirale e antitumorale di cellule dendritiche, di monociti, di Natural Killer e di linfociti T. In particolare TRAIL rappresenta un importante effettore dell'attività antitumorale e antivirale di IFN γ :

- l'espressione di TRAIL aumenta notevolmente nelle cellule Natural Killer del fegato in risposta a IFN γ e contribuisce così a prevenire lo sviluppo di metastasi epatiche;

- IFN γ può agire direttamente sul promotore di TRAIL aumentandone così l'espressione nelle cellule vicine a quelle infettate, in modo tale che solo le cellule infettate siano sensibili all'effetto apoptogeno di TRAIL.

TRAIL rappresenta quindi una molecola effettrice nell'immunosorveglianza, cooperando con altri ligandi di morte nell'indurre l'apoptosi delle cellule tumorali riconosciute dal sistema immunitario. Studi su topi TRAIL deficienti hanno inoltre dimostrato che TRAIL può mediare l'eliminazione dei macrofagi presentanti l'antigene attraverso i linfociti CD4⁺ e che è coinvolto nel processo di maturazione dei timociti, anche se non è l'unico fattore responsabile di tale processo di selezione negativa dei timociti immaturi.

Questi studi hanno evidenziato anche l'importante ruolo che TRAIL svolge nel controllo dei processi infiammatori autoimmuni: una mancata espressione di TRAIL infatti aumenta la suscettibilità a malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla (LeBlanc & Ashkenazi, *Cell Death Differ* 2003; Kimberley & Screaton, *Cell Res* 2004).

Si può infine ipotizzare un coinvolgimento del sistema TRAIL/TRAIL-R nella biologia endoteliale e nel differenziamento delle linee mieloidi. TRAIL non mostra alcun effetto tossico significativo su colture primarie di cellule endoteliali, nonostante l'espressione dei recettori di morte. Al contrario promuove la sopravvivenza delle cellule endoteliali coltivate in assenza di fattori di crescita e siero attraverso l'attivazione di Akt e promuove la proliferazione delle cellule endoteliali a un livello comparabile a quello del VEGF. Similmente al VEGF, TRAIL induce infatti il rilascio di ossido nitrico (NO) da parte delle cellule endoteliali attraverso l'attivazione del complesso dell'ossido nitrico sintetasi (eNOS). Analogamente TRAIL promuove la proliferazione delle cellule muscolari lisce dei vasi attraverso l'attivazione della cascata di segnalazione Akt-ERK1/2. E' da sottolineare il fatto che questi pathways (Akt, ERK ed eNOS) giocano ruoli fondamentali in numerose funzioni endoteliali e nel promuovere l'angiogenesi (Zauli et al., *Circ Res* 2003).

Sono stati infine eseguiti alcuni studi per verificare quale effetto biologico avesse TRAIL sulle linee cellulari mieloidi. A questo scopo sono state utilizzate sia linee cellulari derivante da leucemie mieloidi acute (HL60) sia colture primarie di progenitori mieloidi (CD34⁺) (Secchiero et al., *Blood* 2002; Campioni et al., *Am J Pathol* 2005). In entrambi i

casi il trattamento con TRAIL ha portato all'espressione della glicoproteina di membrana CD14 e di CD11b, tipici marker delle cellule mieloidi e correlati con la maturazione in senso monocitico. In particolare si è visto che tale meccanismo di maturazione era mediato dai recettori di membrana di TRAIL (soprattutto TRAIL-R1) e che l'attivazione delle caspasi svolgeva un ruolo fondamentale nel processo di maturazione.

Questo dimostra che tale famiglia di proteasi è coinvolta in molti processi cellulari, tra cui la differenziazione terminale degli eritroblasti. E' stato infatti dimostrato che TRAIL in vitro non solo induce apoptosi degli eritroblasti immaturi (che esprimono ad alto livello il CD71 ma a basso livello la glicoforina-A) ma previene il proseguimento del processo di differenziamento degli eritroblasti che già hanno intrapreso il cammino di differenziamento, tramite l'attivazione delle ERK (Secchiero et al., *Blood* 2004; Mirandola et al., *Blood* 2006).

E' stato inoltre dimostrato che TRAIL può essere coinvolto nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule T, si è visto infatti che cellule T umane FADD-deficienti (proteina adattatrice coinvolta nella cascata di segnalazione di TRAIL) non solo non erano più sensibili al segnale apoptotico, ma non erano più in grado di proliferare e differenziarsi. Ulteriore prova del coinvolgimento delle caspasi in tali processi, in particolare della caspasi-3 e della caspasi-8 ma non della caspasi-9, è stata ottenuta trattando le cellule T con inibitori delle caspasi: in seguito a tale trattamento proliferazione e differenziamento risultavano inibiti (Kennedy et al., *J Exp Med* 1999; Alam et al., *J Exp Med* 1999).

Struttura dei recettori di TRAIL

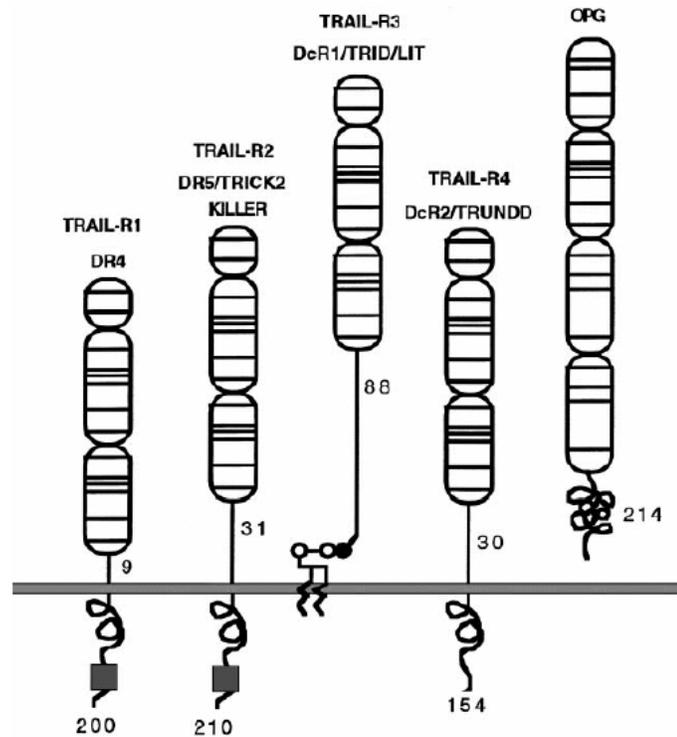
Similmente agli altri membri della famiglia del TNF, come TNF- α , FasL, che vengono chiamati anche *ligandi di morte*, TRAIL è in grado di attivare un programma di morte cellulare in seguito al legame con specifici recettori di membrana. TRAIL infatti è un ligando omotrimerico in grado di interagire con membri specifici della famiglia dei recettori di TNF grazie alla presenza di domini extracellulari CRD (Wang & El-Deiry, *Oncogene* 2003).

Fino ad ora sono stati identificati quattro distinti recettori di membrana ad alta affinità appartenenti alla famiglia dei recettori di morte del TNF, che sono indicati con TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1) e TRAIL-R4 (DcR2). La

ridondanza nell'espressione e funzione dei recettori di TRAIL mette in evidenza una grande complessità del sistema TRAIL/TRAIL-R: solamente TRAIL-R1 e TRAIL-R2 trasducono un segnale apoptotico in seguito al legame con TRAIL, mentre TRAIL-R3 e TRAIL-R4, che sono omologhi a DR4 e DR5 nei loro domini extracellulari ricchi di cisteine, mancano del dominio di morte intracellulare (DD) e della capacità di indurre apoptosi. E' stato inoltre identificato un quinto recettore in forma solubile chiamato osteoprotegerina (OPG), inizialmente considerato un recettore per RANKL/OPGL, che è caratterizzato da quattro domini extracellulari ricchi di cisteine, una struttura dimerica, a differenza degli altri recettori di TRAIL che invece sono in forma trimérica, e numerosi siti di glicosilazione. Il recettore OPG inoltre mostra una bassa affinità per TRAIL (LeBlanc & Ashkenazi, *Cell Death Differ* 2003).

I recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2, così come TRAIL-R3 e TRAIL-R4, sono caratterizzati da due domini extracellulari CRD, mentre gli altri membri della famiglia dei recettori di TNF ne possiedono almeno tre (Sheridan et al., *Science* 1997). TRAIL-R2 inoltre possiede due domini DD che mostrano un maggior grado di omologia con quelli di TRAIL-R1 piuttosto che con i DD dei recettori di FasL o TNF. Attualmente sono state identificate due forme di TRAIL-R2, derivanti da splicing alternativo, che differiscono per la presenza di una sequenza di 23 aa tra il dominio transmembrana e il primo CRD, anche se non sembrano avere funzioni differenti. Si è visto inoltre che l'over-espressione dei recettori di morte DR4 e DR5 attraverso una trasfezione transiente può causare morte cellulare spontanea (Kimberley & Screaton, *Cell Res* 2004).

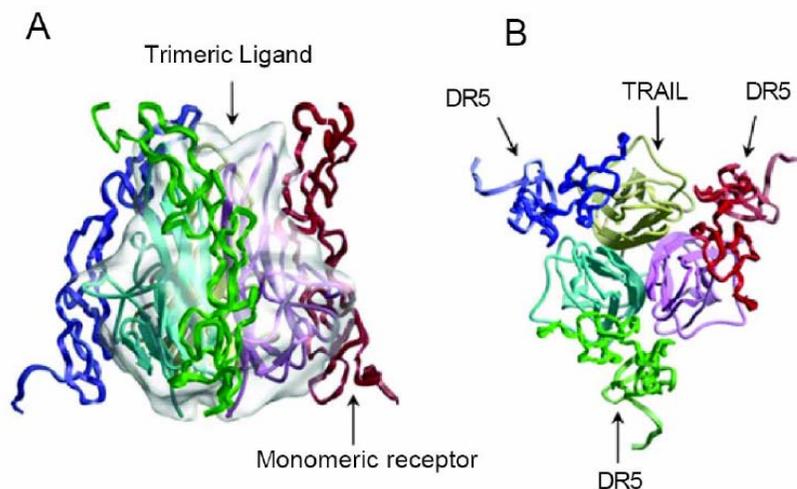
La parziale (TRAIL-R4) o totale (TRAIL-R3) mancanza dei domini di morte condiziona l'incapacità di TRAIL-R3 e TRAIL-R4 di indurre la morte cellulare, pur legando TRAIL grazie alla presenza dei domini cisteinici extracellulari. Questi recettori vengono detti per tale motivo "decoy", servendo da semplice esca per il ligando che in questo modo viene sequestrato dal circolo e non è più disponibile per il legame con TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (Wang & El-Deiry, *Oncogene* 2003). Si pensa che anche OPG abbia lo stesso effetto di competizione per il legame di TRAIL (**Figura 13**).



Adattata da *Degli-Esposti, J Leukoc Biol 1999*

Figura 13: Struttura dei recettori di TRAIL. I domini di legame extracellulari sono evidenziati con un ovale e in particolare le linee nere indicano i residui cisteinici altamente conservati nella famiglia dei TNF-R, responsabili della formazione dei legami disolfuro. Sono inoltre indicati il numero di residui amminoacidici dei peptidi linker e delle code citoplasmatiche. Si noti che TRAIL-R3 non possiede il dominio di morte (quadrato nero) ed è legato alla membrana grazie ad un'ancora di glicofosfatidil-inositolo (GPI) mentre TRAIL-R4 possiede un dominio di morte troncato. OPG, la forma solubile del recettore di TRAIL, è caratterizzato da 4 domini cisteinici.

Come per il ligando, anche i recettori di TRAIL si trovano sulla membrana plasmatica in forma trimerica. A seguito della contemporanea espressione di diversi tipi di recettori per TRAIL, le varie combinazioni dei recettori nelle triadi risultano in una differente capacità di segnalazione e quindi in una differente sensibilità della cellula a TRAIL. La formazione del recettore omotrimerico puro formato da TRAIL-R1 o TRAIL-R2, così come di un recettore eterotrimerico misto TRAIL-R1 ed TRAIL-R2, permette la giustapposizione dei domini DD intracellulari facilitando così il reclutamento dei componenti di segnalazione e quindi l'attivazione della cascata apoptotica (Kimberley & Screaton, *Cell Res 2004*) (**Figura 14**).



Adattata da Kimberley & Screaton, *Cell Res* 2004

Figura 14: Struttura cristallina del complesso TRAIL-R2-ligando. (A) I monomeri di TRAIL sono rappresentati in giallo, rosa e turchese mentre i monomeri di TRAIL-R2 che costituiscono il recettore omotrimerico sono rappresentati in rosso, verde e blu. (B) Visione dal basso dello stesso complesso.

Distribuzione tissutale dei recettori di TRAIL

In generale i recettori di morte sono espressi in modo ubiquitario sia nei tessuti sani che tumorali a differenza dei recettori decoy che invece vengono espressi prevalentemente nei tessuti sani.

E' stata quindi studiata l'espressione degli mRNA di TRAIL-R2 e TRAIL-R3 nei tessuti sani e in linee cellulari tumorali umane. In particolare si è visto che il trascritto di TRAIL-R3 è abbondante in molti tessuti come milza, polmone, placenta e PBL, mentre l'espressione di TRAIL-R2 è relativamente evidente in tessuti fetali come fegato e polmone e tessuti adulti come milza, ovaio, placenta, polmone, fegato, rene e PBL. Molte linee cellulari al contrario esprimono ad elevati livelli TRAIL-R2 ma non TRAIL-R3. Si è visto inoltre che l'espressione di TRAIL-R1 e TRAIL-R2 aumenta notevolmente nei linfociti attivati e che tutti i recettori di TRAIL sono espressi maggiormente in risposta all'aumento di p53 in seguito a danni al DNA.

L'espressione dei recettori decoy in tessuti normali, ma non in molte linee cellulari tumorali, suggerisce dunque una spiegazione alla resistenza mostrata dalle cellule sane all'effetto apoptotico di TRAIL rispetto alle cellule tumorali. E' stato quindi proposto che i

recettori decoy abbiano una funzione protettiva per le cellule sane agli effetti apoptotici di TRAIL (Sheridan et al., *Science* 1997).

La via di segnalazione di TRAIL

Il primo evento fondamentale per l'attivazione della cascata di segnalazione di TRAIL è rappresentato dal riconoscimento ligando-recettore che, come si è detto, consiste nel legame di TRAIL ai domini CRD dei recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2. Tale legame induce la trimerizzazione dei recettori e dunque il "clustering" dei DD a livello intracellulare.

TRAIL è in grado di indurre apoptosi indistintamente mediante DR4 o DR5, infatti in cellule che esprimono entrambi i recettori questi possono formare eterotrimeri funzionali.

L'evento biochimico immediatamente successivo al legame di TRAIL ai recettori DR4 o DR5 è il reclutamento di proteine di segnalazione a livello dei domini di morte intracellulari con la formazione di una struttura chiamata *DISC*. I recettori di morte reclutano infatti, come nel caso di FasL e del suo recettore CD95, la molecola adattatrice *FADD*, il cui coinvolgimento è stato dimostrato mediante immunoprecipitazione dei componenti endogeni di *DISC* ed attraverso la creazione di linee cellulari *FADD*-deficienti: queste ultime diventano infatti resistenti all'effetto apoptotico indotto da TRAIL.

FADD a sua volta contiene dei domini di morte nella porzione C-terminale, che tendono ad associarsi con i DD del recettore trimerico, ma anche dei domini di morte effettori (*DED*) al N-terminale che reclutano la procaspasi-8 poco dopo il legame di TRAIL al recettore. Questa oligomerizzazione induce un'autoattivazione della procaspasi-8 (55 kDa) mediante taglio proteolitico, come dimostra il permanere del frammento clivato (37 kDa) ancorato a *DISC*.

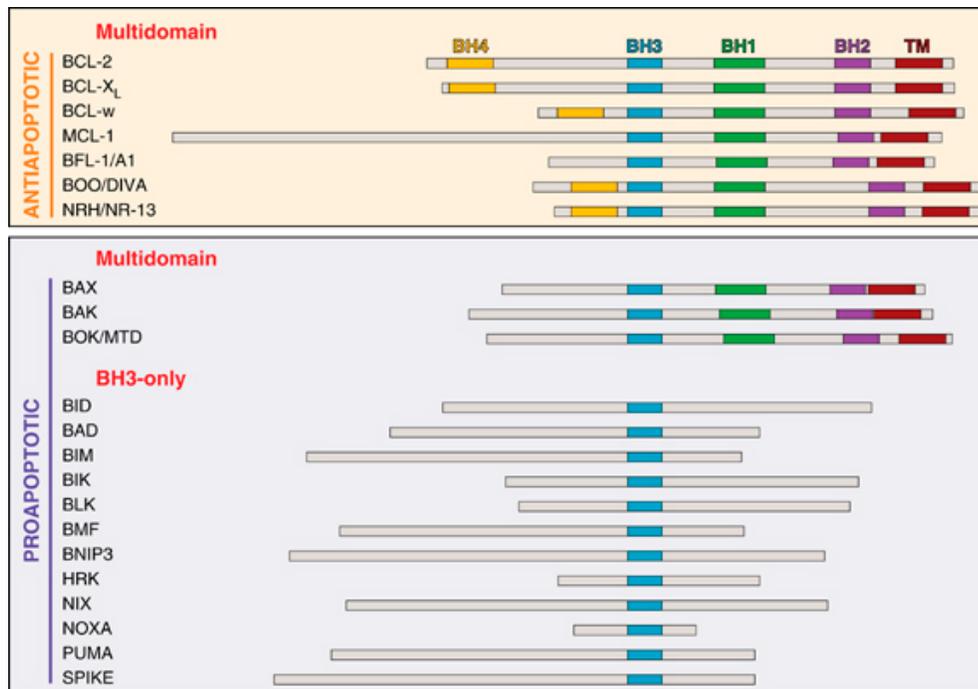
Si può quindi dire che, attraverso il reclutamento della molecola adattatrice *FADD*, TRAIL induce l'attivazione di una cascata di cistein proteasi denominate caspasi che si suddividono in iniziatrici (caspasi-8, -9, -10) ed effettrici (caspasi-3, -6, -7); queste ultime coinvolte nell'esecuzione della fase terminale dell'apoptosi. Tutte le caspasi sono sintetizzate come zimogeni e necessitano di un taglio proteolitico per essere attivate; l'enzima attivo è un eterotetramero formato da 2 subunità catalitiche di circa 20 kDa e da due subunità di circa 10 kDa.

Famiglia Bcl-2

Bcl-2 è il membro principale di una famiglia di proteine che regolano la morte cellulare (Pegoraro et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; Bakhshi et al., *Cell* 1985). Arrangiamenti genici portano *Bcl-2* sotto il controllo trascrizionale del locus per la catena pesante delle immunoglobuline, correlando alti livelli di espressione di Bcl-2 con la sopravvivenza cellulare patologica (McDonnell et al., *Cell* 1989). L'attività oncogena di Bcl-2 deriva dalla sua capacità di inibire la morte cellulare in seguito a diversi stimoli (Hockenbery et al., *Nature* 1990). La famiglia Bcl-2 attualmente include sia proteine proapoptotiche che antiapoptotiche, che costituiscono una rete di controllo e bilanciamento per la regolazione del destino cellulare (Danial & Korsmeyer, *Cell* 2004). La deregolazione delle proteine della famiglia Bcl-2 può portare ad un eccesso di morte cellulare, come nelle patologie neurodegenerative (Raff et al., *Science* 2002), o in un eccesso di sopravvivenza cellulare, come nei tumori (Baliga & Kumar, *Hematol Oncol* 2002).

Le proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 possono essere classificate in tre gruppi, in base alle loro caratteristiche sia strutturali (Petros et al., *Biochim Biophys Acta* 2004) che funzionali (**Figura 15**):

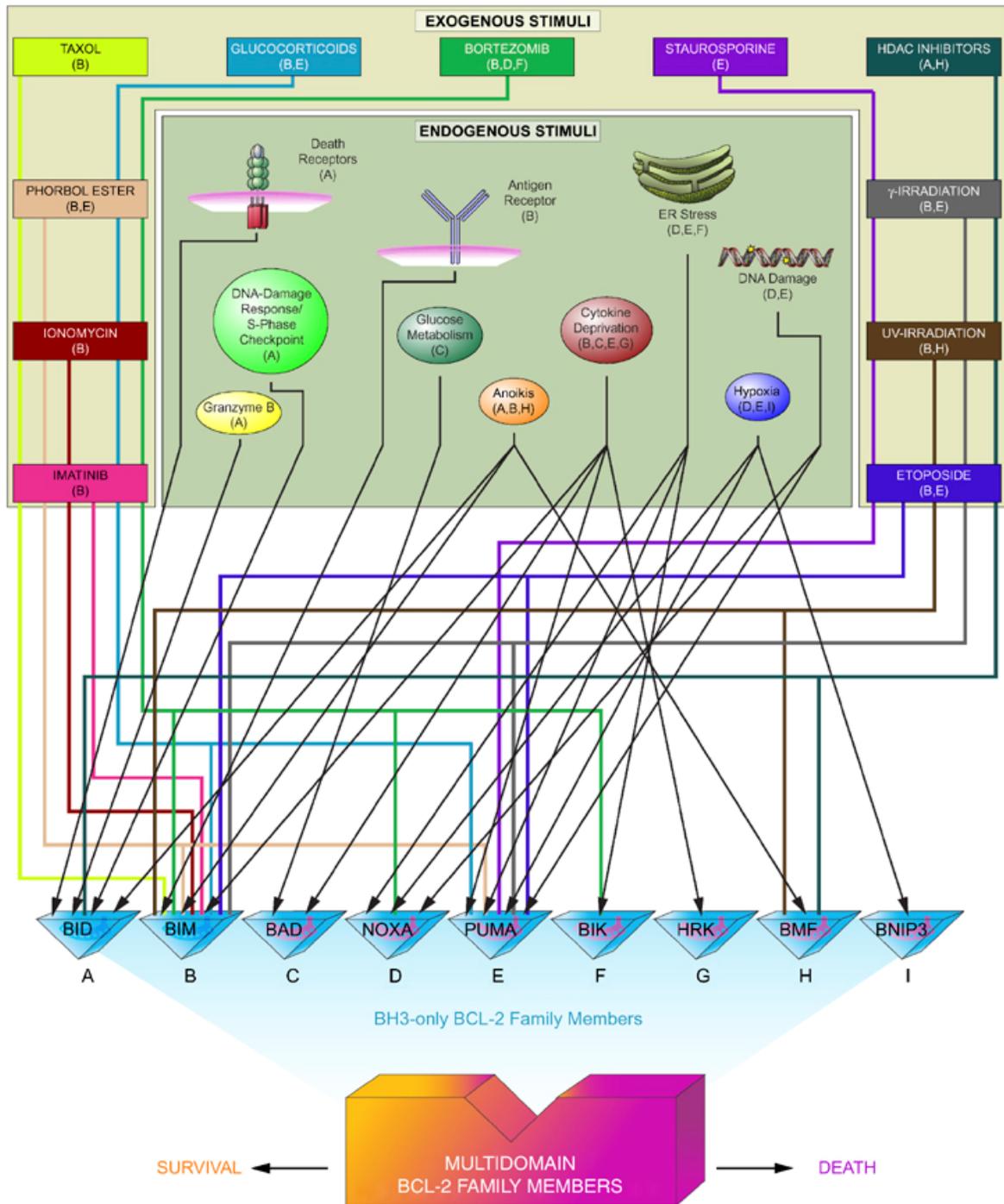
- il primo gruppo comprende le *proteine antiapoptotiche multidominio* Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo/Diva e NR-13. Queste proteine antiapoptotiche presentano quattro domini conservati di omologia con Bcl-2 (BH1-4).
- il secondo gruppo coinvolge le *proteine proapoptotiche multidominio* Bax, Bak e Bok/Mtd, che contengono tre domini (BH1-3).
- il terzo gruppo, considerato anche un sottogruppo delle proteine proapoptotiche, è costituito dalle *proteine solo-BH3* Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Nix, BMF, Noxa e Puma, che presentano solo il terzo dominio BH conservato.



Adattata da Walensky, *Cell Death Differ* 2006

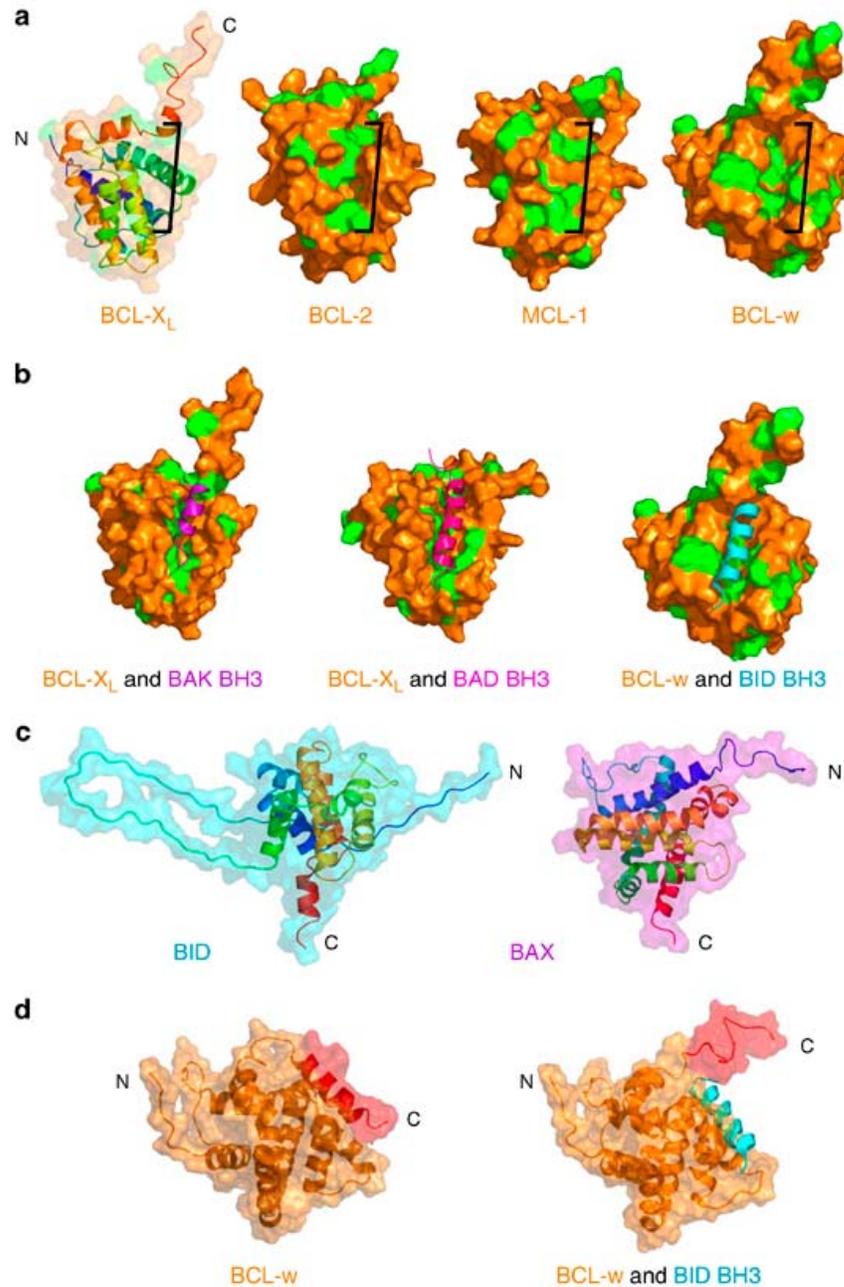
Figura 15. Struttura delle proteine della famiglia Bcl-2. I membri della famiglia Bcl-2 sono definiti strutturalmente dal loro dominio di omologia con Bcl-2 (BH) e funzionalmente raggruppate in categorie in base alla loro capacità di inibire o attivare la morte cellulare. Nello schema le proteine sono state allineate in base al loro dominio BH3.

Le interazioni tra le diverse proteine della famiglia Bcl-2 sono molto complesse e non ancora del tutto note. Diverse vie di segnalazione coinvolgono l'apoptosi tramite proteine contenenti il solo dominio BH3 (Huang & Strasser, *Cell* 2000), che agiscono come sentinelle di morte trasmettendo segnali di danno cellulare agli altri membri della famiglia Bcl-2 (**Figura 16**). Per esempio, l'attivazione dei recettori di morte per Fas e TNF-1 promuovono l'attivazione della caspasi-8 che a sua volta attiva Bid (Luo et al., *Cell* 1998), il quale in forma N-terminale troncata (tBid), viene miristilato e così facilitato nella localizzazione mitocondriale e nella conseguente trasmissione di segnali apoptotici agli altri membri della famiglia Bcl-2 (Zha et al, *Science* 2000). Le proteine solo-BH3 possono promuovere l'apoptosi antagonizzando le proteine multidominio, per cui sono considerate dei *sensibilizzatori*, *derepressori* o *attivatori*.



Adattata da Walensky, *Cell Death Differ* 2006

Figura 16. Schema delle vie di segnale indotte da stimoli apoptotici. Segnali citotossici possono attivare il meccanismo di apoptosi mediante diversi sistemi, reclutando specifiche proteine solo-BH3, che legano poi proteine multidominio.



Adattata da Walensky, *Cell Death Differ* 2006

Figura 17. Modello della struttura dei membri della famiglia di Bcl-2. Le eliche comuni a tutte le proteine sono state riportate col medesimo colore. **(A)** Proteine multidominio antiapoptotiche (il solco idrofobico è indicato con una linea nera). **(B)** Complesso costituito dalle proteine multidominio antiapoptotiche (residui idrofobici in verde) e il dominio BH3 (elica) di altri membri. **(C)** La proteina solo-BH3 Bid presenta una lunga porzione N-terminale che contiene il sito per il clivaggio della caspasi-8; Bax presenta una porzione C-terminale caratterizzata da una nona α -elica (rossa), che può regolare l'accesso al solco idrofobico. **(D)** Anche Bcl-xL presenta una porzione C-terminale con la nona α -elica (rossa) che copre il solco idrofobico in assenza di legame con proteine solo-BH3 e che viene spostata in seguito all'interazione con Bid (azzurro).

Proteine antiapoptotiche multidominio

Presentano i quattro domini conservati di omologia con Bcl-2 (BH1-4), essenziali per la funzione di indurre la sopravvivenza attraverso la mediazione delle interazioni proteina-proteina, e un dominio transmembrana, formato da una serie di aa idrofobici vicino alla porzione C-terminale. Il dominio C-terminale è necessario per l'ancoraggio, o l'inserzione, nelle membrane cellulari di mitocondri, nucleo e reticolo endoplasmatico (del Mar Martinez-Senac et al., *Biochemistry* 2000).

La struttura di Bcl-xL consiste di otto α -eliche (**Figura 17 A**), due delle quali formano un *core* idrofobico, reminiscenza del dominio di inserzione di membrana di tossine che forma un poro (Muchmore et al., *Nature* 1996). Questa analogia di struttura conferma che i membri della famiglia Bcl-2 possono indurre la formazione di pori in liposomi e mitocondri (Schendel et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1997). Un'altra caratteristica strutturale di Bcl-xL è stata identificata sulla superficie della proteina; un solco idrofobico formato all'apice dalla confluenza dei domini BH1, 2, e 3 e alla base dalle α -eliche 3 e 4. Questo solco corrisponde al sito di interazione di Bcl-xL con una proteina solo-BH3 (Sattler et al., *Science* 1997) (**Figura 17 B**). La struttura del complesso Bcl-xL/Bak suggerisce la presenza di una interazione funzionale tra la α -elica del dominio BH3 di Bak con il solco idrofobico formato dai domini BH1-3 di Bcl-xL (Sattler et al., *Science* 1997). Questo modello d'interazione proteina-proteina suggerisce che i membri antiapoptotici possano agire come trappole funzionali per i membri proapoptotici, ma lascia ancora molti punti oscuri sul normale stato fisiologico della cellula e sulla regolazione delle interazioni fra proteine proapoptotiche ed antiapoptotiche.

E' stato dimostrato che Bcl-2 modula la vitalità cellulare regolando l'omeostasi del calcio intracellulare, lo stato di riduzione, l'ossidazione lipidica, come anche il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri (He et al., *J Cell Biol* 1997; Bruce-Keller et al., *J Neurochem* 1998; Bogdanov et al., *Neurosci Lett* 1999; Yang et al., *Science* 1997). L'over-espressione di Bcl-2 protegge le cellule SW480 dall'apoptosi indotta da TRAIL attraverso l'attenuazione dell'attivazione della caspasi-8 e della scissione di Bid e della caspasi-3 (Sinicrope et al., *Clin Cancer Res* 2004). Al contrario, è stato proposto che le vie di segnalazione apoptotica indotte da Fas/FasL, TRAIL e TNF- α siano insensibili al blocco da parte di Bcl-2/Bcl-xL (Memon et al., *J Immunol* 1995; Gazitt et al., *Cytokine* 1999; Keogh et al., *FEBS Lett* 2000); comunque, non è ancora noto quale sia l'esatto contributo di Bcl-

2/Bcl-xL nella via estrinseca apoptotica mediata da recettore. Sembra che Bcl-xL e Bcl-2 siano in grado di inibire la formazione dell'apoptosoma sequestrando Apaf-1 (Conus et al., *Cell Death Differ* 2000), abrogare la traslocazione mitocondriale e oligomerizzazione di Bax (He et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2003) e interferire con l'oligomerizzazione e attivazione di Bak (Willis et al., *Genes Dev* 2005).

Comunque, l'attività di Bcl-xL e Bcl-2 potrebbe essere regolata, oltre che dai loro livelli di espressione, anche da modificazioni post-traslazionali come fosforilazione e scissione proteolitica delle proteine. Infatti, la fosforilazione alla Ser-70 di Bcl-2 a carico di PKC è necessaria per la sua funzione antiapoptotica (Ito et al., *J Biol Chem* 1997). Al contrario, l'iperfosforilazione di Bcl-2 (Ser-70, Ser-87 e Thr-69) abroga la sua azione antiapoptotica (Yamamoto et al., *Mol Cell Biol* 1999). La fosforilazione di Bcl-xL alla Ser-62 da parte di JNK in risposta a trattamenti con tassolo si oppone all'azione antiapoptotica di Bcl-xL e rende le cellule tumorali di prostata sensibili all'apoptosi (Basu & Haldar, *FEBS Lett* 2003). Il clivaggio della porzione N-terminale caspasi-dipendente di Bcl-2/Bcl-xL porta all'esposizione del loro dominio BH3, rendendo queste proteine, normalmente antiapoptotiche, proapoptotiche. Il clivaggio di Bcl-2 indotto da chemioterapia è mediato dalle caspasi e risulta nella formazione di un frammento di Bcl-2 di 23 kDa (Fadeel et al., *Leukemia* 1999). Questa proteolisi di Bcl-2 indotta dalla caspasi-3 sembra aumentare l'attivazione delle caspasi, favorendo la segnalazione apoptotica (Kirsch et al., *J Biol Chem* 1999). Per Bcl-xL è stato dimostrato che la caspasi-3 taglia la proteina dopo i residui Asp-61/Asp-76 e la calpaina dopo Ala-60, formando dei frammenti che costituiscono canali nelle membrane lipidiche per il rilascio del citocromo *c* (Basanez et al., *J Biol Chem* 2001).

Proteine proapoptotiche multidominio

Per quanto riguarda le proteine proapoptotiche, l'analisi mediante risonanza magnetica nucleare rivela un'architettura molto simile per le proteine solo-BH3 Bid e proapoptotica multidominio Bax (**Figura 17 C**). Bid e Bax possiedono due *core* centrali costituiti rispettivamente da 6 e da 7 eliche. Le loro porzioni N-terminale di Bid, Bax, Bcl-2 e Bcl-xL contengono dei loop specifici per sequenza e lunghezza che sembrano regolare l'azione apoptotica. In generale, fosforilazioni o clivaggi a livello di queste porzioni favoriscono e aumentano l'attività apoptotica di tutti i membri della famiglia Bcl-2.

Bax è localizzato prevalentemente nel citoplasma o lassamente adeso, in forma monometrica, alla superficie esterna delle membrane dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico. In seguito ad uno stimolo apoptotico, Bax subisce un'unica modificazione conformazionale esponendo il suo dominio idrofobico C-terminale, che interviene nell'ancoraggio della proteina alla membrana mitocondriale (Nechushtan et al., *EMBO J* 1999). A livello delle membrane mitocondriali, Bax può formare dimeri, oligomeri o multimeri altamente organizzati (Antonsson et al., *J Biol Chem* 2001). Bak, invece, è una proteina integrale delle porzioni esterne delle membrane dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico, che in seguito a stimolo apoptotico subisce una modificazione conformazionale – conformazione aperta – che induce l'esposizione della porzione N-terminale, con la quale può interagire con Bcl-2 (Ruffolo & Shore, *J Biol Chem* 2003). Il principio di queste modificazioni nella struttura e nell'oligomerizzazione delle proteine Bak e Bax deve essere ancora spiegata a livello strutturale. Il coinvolgimento di Bak e Bax nel meccanismo apoptogenico è stato dimostrato da numerosi studi. Cellule prive di Bax sono resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL (Deng et al., *Genes Dev* 2002). La carenza di Bax non interferisce con il clivaggio della caspasi-8 o di Bid indotto da TRAIL, ma abroga il rilascio di Smac/DIABLO, che è necessario per l'inibizione delle proteine IAP e per l'attivazione della caspasi-3 (Deng et al., *Genes Dev* 2002). In cellule leucemiche resistenti a TRAIL, prive di Bax e Bak, il rilascio di proteine mitocondriali è impedito, mentre l'induzione dell'espressione di Bax, ma non di Bak, le rende sensibili a TRAIL, come dimostrato dall'aumento di apoptosi e dell'attivazione della caspasi-3 (Han et al., *Leukemia* 2004). Recentemente, è stato dimostrato che Bax e Bak regolano l'attivazione caspatica indotta da danni al DNA e da stress del reticolo endoplasmatico (Ruiz-Vela et al., *EMBO Rep* 2005).

La modificazione post-traslazionale di Bax o Bak influenza il loro ruolo nel processo apoptotico. Infatti, la conversione di Bax in una forma troncata (p18 Bax), dovuta al clivaggio di 33 aa alla porzione N-terminale, aumenta le sue proprietà proapoptotiche. In seguito alla formazione di p18 Bax, questa proteina troncata si comporta come un membro solo-BH3 e la sua maggiore attività apoptotica sembra essere correlata con un aumento di affinità per Bcl-xL.

Proteine solo-BH3

Il terzo gruppo della famiglia Bcl-2 comprende le proteine solo-BH3, caratterizzate dalla presenza di un unico dominio di omologia e che agiscono inibendo Bcl-2/Bcl-xL e attivando Bak e Bax. Queste agiscono come le sentinelle del sistema di sensibilizzazione alla morte cellulare e coordinano il delicato processo di risposta all'apoptosi mediante la loro interazione con le proteine multidominio pro- e antiapoptotiche.

La funzione delle proteine solo-BH3 nei mitocondri è caratterizzata da due vie di segnalazione principali:

- *Attivatori diretti*: Bid e Bim interagiscono con le proteine multidominio proapoptotiche, come Bak e Bax, inducendo la loro attivazione/oligomerizzazione. Questa particolare attività delle proteine solo-BH3 può essere attenuata mediante il loro sequestro da parte di Bcl-2, che opera in questo modo un silenziamento funzionale.
- *Sensibilizzatori*: Bad interagisce con le proteine multidominio antiapoptotiche, impedendo loro di legare e sequestrare proteine solo-BH3, come Bid e Bim, che in questo modo possono poi attivare Bak e Bax.

La funzionalità delle proteine solo-BH3 a livello cellulare può essere regolata a diversi livelli:

- *Fosforilazione*: la fosforilazione selettiva a carico di vari residui di serina può modulare le diverse risposte molecolari e cellulari, quali un aumento dell'attività proapoptotica. Per esempio, segnali di sopravvivenza cellulare possono indurre la fosforilazione di Bad, interferendo con il suo sequestro ed inattivazione da parte della famiglia delle proteine 14-3-3 (Datta et al., *Mol Cell* 2000). Inoltre, la fosforilazione di Bim, da parte di JNK, favorisce l'apoptosi indotta da Bax (Putchá et al., *Neuron* 2003).
- *Controllo trascrizionale*: Puma e Noxa sono bersagli trascrizionali di p53. Puma interagisce nei mitocondri con Bcl-2 e Bcl-xL mediante il suo dominio BH3 e il suo effetto proapoptotico dipende dalle modificazioni conformazionali e dalle multimerizzazioni di Bax (Yu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2003), contrariamente a Noxa (Oda et al., *Science* 2000).

- *Clivaggio*: in seguito a segnali apoptotici mediati da recettori di morte, la proteina Bid di 22 kD subisce un'idrolisi, con la conseguente creazione di una forma troncata (tBid) (Li et al., *Cell* 1998) di 15 kD, che viene miristilata a livello del nuovo residuo terminale. Avvenute queste modificazioni, tBid localizza nei mitocondri ed induce l'oligomerizzazione di Bax e di Bak.

Alcune delle proteine multidominio pro- ed antiapoptotiche, in particolare Bax e Bcl-w, contengono un dominio transmembrana C-terminale che si inserisce nella porzione esterna della membrana mitocondriale definito strutturalmente come una nona α -elica (Hinds et al, *EMBO J* 2003). Bid, invece, non presenta questa porzione per cui interagisce con i lipidi di membrana con le sue eliche poste parallelamente alla superficie (Oh et al., *J Biol Chem* 2005) (**Figura 17 C e D**). Queste particolari α -eliche si ripiegano a livello del solco idrofobico con un orientamento opposto a quello delineato per l'interazione di Bak e Bad con Bcl-xL. Le eliche C-terminali, infatti, impediscono sia l'accesso al solco che l'esposizione del dominio BH3 e dei residui idrofobici (**Figura 17 D**). Tale struttura C-terminale favorisce la distribuzione di Bax e Bcl-w a livello del citoplasma sino a che non avviene la loro modificazione conformazionale, che prevede il rilassamento della nona α -elica, e di conseguenza l'inserzione nella membrana (Hinds et al, *EMBO J* 2003). Per cui ostruendo il sito di interazione proteica, la nona α -elica contribuisce al mantenimento di Bax e Bcl-w in forma monometrica.

L'esatto meccanismo di come i membri della famiglia Bcl-2 regolino la formazione di pori a livello mitocondriale e di come specifiche proteine solo-BH3 possano legare membri multidominio proapoptotici rappresenta tutt'ora un argomento di intenso studio. Nuovi dettagli sulla complessità delle modificazioni strutturali, che coinvolgono i membri della famiglia Bcl-2 durante l'induzione dell'apoptosi mitocondriale, sono stati ottenuti dallo studio strutturale delle interazioni di queste proteine con la porzione lipidica delle membrane (Denisov et al., *Biochemistry* 2006). Inoltre, la definizione degli avvolgimenti ad elica che formano sia il solco nelle proteine multidominio che il suo ligando BH3, costituisce il razionale per lo sviluppo di nuove molecole disegnate selettivamente per indurre apoptosi.

Meccanismo apoptotico: il controllo della morte cellulare

L'apoptosi è un complesso processo di morte cellulare programmata identificato da specifiche caratteristiche morfologiche come la condensazione della cromatina, la frammentazione nucleare, la diminuzione del citoplasma, la presenza di vesciche a livello della membrana, la formazione di vescicole apoptotiche e la conseguente fagocitosi da parte delle cellule immunitarie (Strasser et al., *Annu Rev Biochem* 2000). Le modificazioni molecolari che avvengono durante l'apoptosi sono la redistribuzione della fosfatidilserina dalla superficie interna della membrana citoplasmatica a quella esterna (esternalizzazione della fosfatidilserina) e il clivaggio del DNA.

L'apoptosi solitamente è indotta da una fase iniziale strettamente dipendente dal tipo di cellula e dalle caratteristiche dello stimolo (origine, durata, ampiezza e presenza di co-stimoli). Vengono attivate simultaneamente delle vie di segnalazione multiple che possono essere immaginate come un "campo di battaglia" fra i modulatori pro- ed antiapoptotici. La battaglia è per stabilire se la cellula deve sopravvivere o morire. Durante questa fase decisiva per l'effetto, gli schemi di segnalazione molecolare sono la parte centrale del sistema apoptotico, che deve naturalmente essere finemente regolato e controllato.

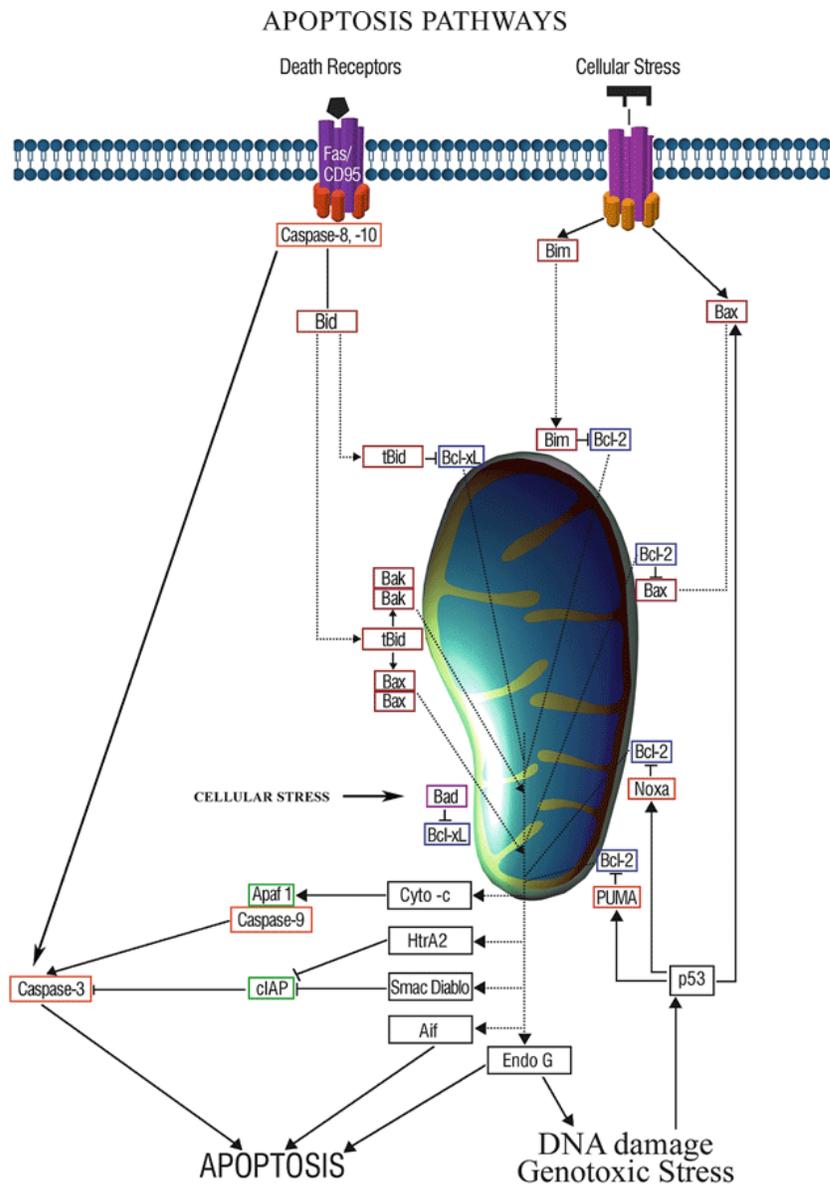
Le caspasi sono proteasi aspartato-specifiche, che hanno un ruolo principale nell'iniziazione e nell'esecuzione del processo di morte cellulare programmata. Le caspasi iniziatrici coinvolte sono le caspasi-8 e -9, che agiscono a monte delle caspasi effettrici (caspasi-3, -6 e -7) (Strasser et al., *Annu Rev Biochem* 2000). Inizialmente si pensava che solo la caspasi 8 rappresentasse la caspasi iniziatrice dell'intera cascata di segnalazione ma studi successivi hanno evidenziato che anche la caspasi 10 può essere reclutata ed attivata dal complesso DISC ed è quindi in grado di trasmettere il segnale apoptotico in assenza della caspasi-8 (LeBlanc & Ashkenazi, *Cell Death Differ* 2003; Wang & El-Deiry, *Oncogene* 2003; Kimberley & Screaton, *Cell Res* 2004).

Normalmente le caspasi sono inattive, o minimamente attive, in cellule sane non stimolate e vengono sbloccate attraverso una serie di eventi di segnalazione come l'attivazione di un recettore di morte, un danno diretto del DNA indotto da chemioterapici o stress cellulare. L'attivazione delle caspasi-9 e -3 avviene nell'apoptosi indotta da LDL

ossidate delle cellule muscolari lisce dell'endotelio vascolare, mentre l'attivazione della caspasi-8 nell'apoptosi di cellule muscolari lisce, macrofagi e cellule endoteliali (Chen et al., *Circ Res* 2004). Nei macrofagi, inoltre, è stato dimostrato che l'apoptosi indotta da LDL ossidate attiva le caspasi-2, -3, -8 e -9 (Vicca et al., *Free Radic Biol Med* 2003).

Negli ultimi decenni, il meccanismo molecolare apoptotico è stato oggetto di intensi studi e sono state identificate due principali vie di segnalazione con componenti comuni (**Figura 18**):

- La *via estrinseca*, che coinvolge direttamente la cascata degli iniziatori attivati dai recettori di morte presenti sulla superficie cellulare. Questa via è indotta dai membri della famiglia del TNF, in particolare l'apoptosi indotta mediante i recettori di TRAIL dipende da segnali cellulari estrinseci che portano alla formazione del complesso DISC e all'attivazione proteolitica della caspasi 3 attraverso la caspasi 8 o 10. A sua volta la caspasi 3 proteolizza i "substrati di morte".
- La *via intrinseca*, che coinvolge mitocondri e segnali di morte intracellulari. Viene innescata in seguito a un danno del DNA, perdita di fattori di sopravvivenza, mancato superamento del checkpoint del ciclo cellulare, problemi nella mitosi dovuti ad ipossia o qualsiasi altro tipo di forte stress cellulare.



Adattata da Kutuk & Basaga, Apoptosis 2006

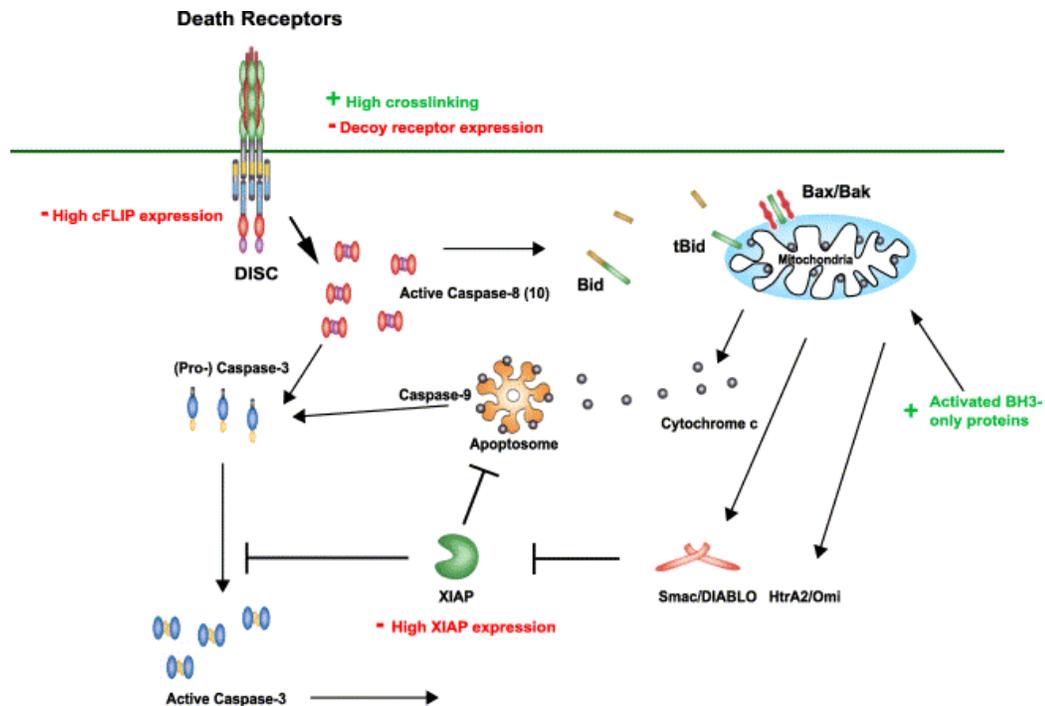
Figura 18. Schema delle due vie di segnalazione apoptotica.

Via estrinseca: sistema mediato dai recettori di morte. Viene attivato in seguito al legame di uno specifico ligando al recettore, che comporta l'attivazione della caspasi-8. Questa può in seguito indurre apoptosi direttamente tramite la caspasi-3 (che può essere inibita dalle proteine cIAP) oppure tramite un segnale di amplificazione che prevede il clivaggio e la traslocazione nei mitocondri di Bid. tBid può interagire con le proteine multidominio proapoptotiche (Bax e Bak) o antiapoptotiche (Bcl-2 e Bcl-xL) e stimolare il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri. La traslocazione del citocromo *c* nel citoplasma permette la formazione dell'apoptosoma, che favorisce l'attivazione della caspasi-9 e la conseguente apoptosi.

Via intrinseca: sistema attivato in seguito a danno cellulare. Il coinvolgimento diretto delle proteine Bcl-2 permette di integrare segnali di sopravvivenza e di morte cellulare. Le proteine proapoptotiche multidominio Bak e Bax formano canali a livello dei mitocondri e facilitano il rilascio di proteine che regolano l'apoptosi (citocromo *c*, HtrA2, Smac/DIABLO, AIF), mentre proteine multidominio antiapoptotiche (Bcl-2 e Bcl-xL) inibiscono questo rilascio. Le proteine proapoptotiche solo-BH3 (Bad, Bim, Bid, Noxa, e Puma) interagiscono selettivamente con le proteine multidominio proapoptotiche (attivatori) o antiapoptotiche (sensibilizzatori) per promuovere l'apoptosi. Smac/DIABLO e HtrA2 prevengono l'inibizione della caspasi-3 indotta da cIAP-1, favorendo la progressione apoptotica.

E' noto che queste due vie condividono delle proteine adattatrici, proteasi, proteine chinasi e fosfatasi, come parte di moduli di segnali apoptotici, anche se il controllo di queste interazioni non è ancora del tutto chiaro.

La via estrinseca, mediata da recettori di morte, è attivata in risposta a segnali proapoptotici extracellulari ed integrata nel meccanismo apoptotico attraverso specifici adattatori dei recettori di morte (**Figura 18**). Come descritto per i recettori di TRAIL, tutti i membri della famiglia dei recettori di morte (CD95/Fas/Apo, TRAIL-R e TNF-R I-II) sono caratterizzati dalla presenza di ripetizioni ricche in cisteina, nel dominio extracellulare, e da moduli di interazione proteina-proteina DD, nella porzione citoplasmatica (Ashkenazi & Dixit, *Science* 1998). Il legame degli specifici ligandi induce la multimerizzazione e la formazione del complesso di segnalazione DISC, che consiste di numerose proteine adattatrici quali TRADD, FADD, Daxx, RIP, RAIDD e FLIP (Ashkenazi & Dixit, *Science* 1998). FADD agisce come un ponte tra DISC e la caspasi-8, fondamentale per il reclutamento e l'oligomerizzazione della caspasi-8 nel complesso DISC, come anche l'attivazione autocatalitica della caspasi-8 e l'attivazione del programma di morte cellulare mediato dai recettori di morte (Bodmer et al, *Nat Cell Biol* 2000). L'attivazione diretta delle caspasi effettrici -3 e -7 da parte della caspasi-8 non necessariamente coinvolge gli eventi mitocondriali; comunque in diversi tipi cellulari i segnali apoptotici mediati dai recettori di morte utilizzano un loop di amplificazione di morte mitocondriale (Soderstrom et al., *J Immunol* 2002). Probabilmente questo meccanismo viene preferito quando l'ammontare delle caspasi attive è insufficiente o quando gli inibitori dell'apoptosi presenti a valle sono in quantità notevole. Il loop di amplificazione mitocondriale coinvolge il clivaggio, mediato dalla caspasi-8, della proteina proapoptotica solo-BH3 Bid, che costituisce l'integrazione della due vie apoptotiche (**Figura 18**). In seguito alla processazione da parte della caspasi-8, Bid trasloca dal citoplasma ai mitocondri, dove oligomerizza con Bax e Bak, e media il rilascio del citocromo *c* (Strasser et al., *Annu Rev Biochem* 2000). Il citocromo *c* nel citoplasma induce la formazione del complesso dell'*apoptosoma*, che è costituito di sette molecole Apaf-1, ciascuna legata ad una molecola di citocromo *c* ed a un dimerico di caspasi-9. La formazione dell'*apoptosoma* comporta l'attivazione della caspasi-9, che a sua volta attiva le caspasi-3 e -7 effettrici per innescare l'esecuzione dell'apoptosi (**Figura 19**).



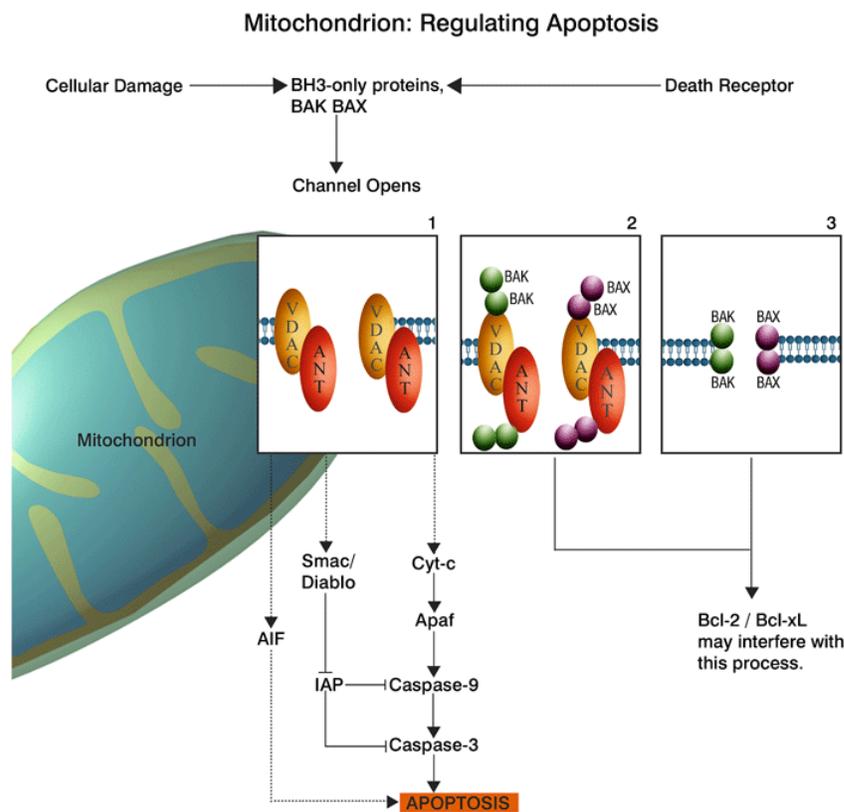
Adattata da Sprick & Walczak, *Biochim Biophys Acta* 2004

Figura 19. Schema delle interazioni fra i membri della famiglia di Bcl-2 e il sistema apoptotico mediato dai recettori di morte. I recettori di morte attivano la caspasi-8 (e -10) a livello del DISC, che a sua volta induce la caspasi-3 all'attivazione autocatalitica. L'attivazione delle caspasi nel DISC può essere inibita da cFLIP. Alternativamente, la corretta formazione del DISC può essere impedita da bassi livelli dei recettori, da proprietà intrinseche dei recettori o dall'espressione dei recettori decoy. A livello mitocondriale l'apoptosi è iniziata dall'attivazione della caspasi-9 nell'apoptosoma. La formazione dell'apoptosoma è innescata dal rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio. A sua volta l'integrità mitocondriale è regolata dal bilanciamento tra proteine multidominio proapoptotiche e antiapoptotiche della famiglia di Bcl-2. La proteina solo-BH3 Bid funge da intermedio tra i recettori di morte e i mitocondri, in seguito al suo clivaggio ed attivazione da parte delle caspasi iniziatrici derivate dal DISC. La caspasi-3 per essere attivata necessita di essere processata in un meccanismo autocatalitico, che può essere inibito da XIAP, che lega le caspasi effettrici. Gli antagonisti di XIAP, Smac/DIABLO e HtrA2/Omi, quando sono rilasciati dai mitocondri alleviano questa inibizione e favoriscono l'avanzamento del processo apoptotico.

La via intrinseca coinvolge direttamente ed attivamente i mitocondri. Viene attivata da stimoli apoptotici recettore-indipendenti come agenti che danneggiano il DNA, radiazioni UV e γ , ipossia e carenza di fattori di crescita. Quando questa via di segnalazione viene stimolata, Bax, membro della famiglia Bcl-2, viene traslocato all'interno dei mitocondri, il potenziale transmembrana viene annullato e fattori che regolano l'apoptosi – come Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 ed il citocromo *c* – vengono rilasciati nel citoplasma (Kutuk & Basaga, *Apoptosis* 2006). Come descritto per la via estrinseca, una volta nel citosol il citocromo *c* lega la proteina adattatrice Apaf-1 formando l'apoptosoma che attiva la caspasi-9, e di conseguenza si ha l'attivazione delle caspasi -3, -6 e -7. Smac/DIABLO

invece promuove l'apoptosi andando a legare le IAP, evitando così che tali fattori possano interagire col proprio bersaglio, impedendo la proteolisi e quindi l'attivazione delle caspasi (Figure 18 e 19).

L'integrità mitocondriale, perciò, risulta essere essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e per la corretta compartimentalizzazione dei mediatori apoptotici. I meccanismi della permeabilizzazione mitocondriale non sono ancora del tutto chiari, ma recenti studi hanno apportato alcune nozioni fondamentali per sviluppare alcuni modelli relativi al meccanismo di uscita delle proteine dai mitocondri in seguito a stimoli apoptotici (Figura 20).

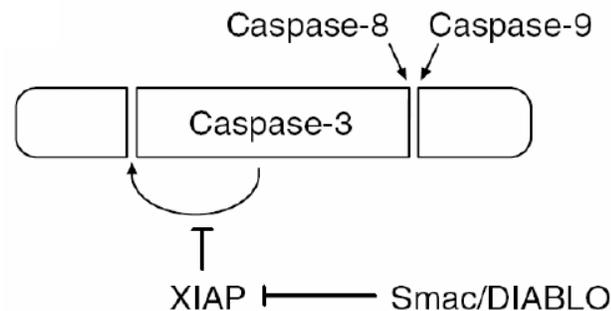


Adattata da Kutuk & Basaga, *Apoptosis* 2006

Figura 20. Modelli proposti per l'uscita delle proteine mitocondriali in seguito a stimoli apoptotici. In seguito ad uno stimolo apoptotico come lo stress cellulare o l'attivazione dei recettori di morte, può essere formato un canale mitocondriale mediante: (1) l'interazione fra un canale anionico voltaggio-dipendente (VDAC) e la traslocasi del nucleotide adenina (ANT); (2) l'interazione fra VDAC-ANT e le proteine multidominio proapoptotiche Bax e Bak; (3) le sole proteine Bax e Bak. Bcl-2 e Bcl-xL possono interferire col processo apoptotico attraverso l'inibizione dell'uscita delle proteine mitocondriali.

La caspasi-9 una volta attivata, processa quindi la caspasi-3 nello stesso sito riconosciuto dalla caspasi-8, questo meccanismo che può risultare ridondante rappresenta un passaggio comune alle due vie di segnalazione. In seguito ad un primo taglio proteolitico catalizzato da tali proteasi l'attivazione completa della caspasi-3 avviene mediante un processo autocatalitico che può essere inibito da XIAP, un importante membro della famiglia delle IAP.

In quest'ottica la carenza di Bax potrebbe quindi ridurre l'innesco della via apoptotica intrinseca, anche se tale blocco nell'attivazione della via mitocondriale può essere superato da una elevata espressione citosolica di Smac/DIABLO: quest'ultimo antagonizzando XIAP promuove l'attivazione della caspasi-3 (**Figura 21**).



Adattata da *LeBlanc & Ashkenazi, Cell Death Differ 2003*

Figura 21. Schema del meccanismo di attivazione della caspasi-3 e mediatori coinvolti in tale processo.

Apoptosi in cellule di tipo I o di tipo II

Sembra dunque che oltre a promuovere l'attivazione della caspasi-9, il sistema mitocondriale contribuisca al processo apoptotico (anche indotto da TRAIL), rilasciando Smac/DIABLO nel citosol e rimuovendo così il blocco di XIAP sulla caspasi-3.

Studi di ablazione genica hanno dimostrato infatti che Bax è assolutamente necessario per l'apoptosi indotta da TRAIL, ma che meccanismi come la formazione del DISC, l'attivazione della caspasi-8 e il taglio di Bid sono indipendenti da Bax. La

depolarizzazione mitocondriale, il rilascio del citocromo *c* e l'attivazione della caspasi-9 invece sono bloccati in cellule Bax-deficienti.

Si è detto che sono possibili due vie di segnalazione apoptotica e che queste condividono numerose molecole, infatti:

- la caspasi-3 può essere attivata sia dalla caspasi-8 (via estrinseca) che dalla caspasi-9 (via intrinseca);
- la caspasi-8 (via estrinseca) può tagliare proteoliticamente Bid, che entrando nel mitocondrio interagisce con Bax e Bak e promuove il rilascio del citocromo *c* (via intrinseca).

Secondo tale meccanismo sembra dunque che l'attivazione della via intrinseca possa amplificare l'apoptosi indotta dal legame di TRAIL ai propri recettori e viceversa, cioè che le due vie apoptotiche si amplifichino a vicenda.

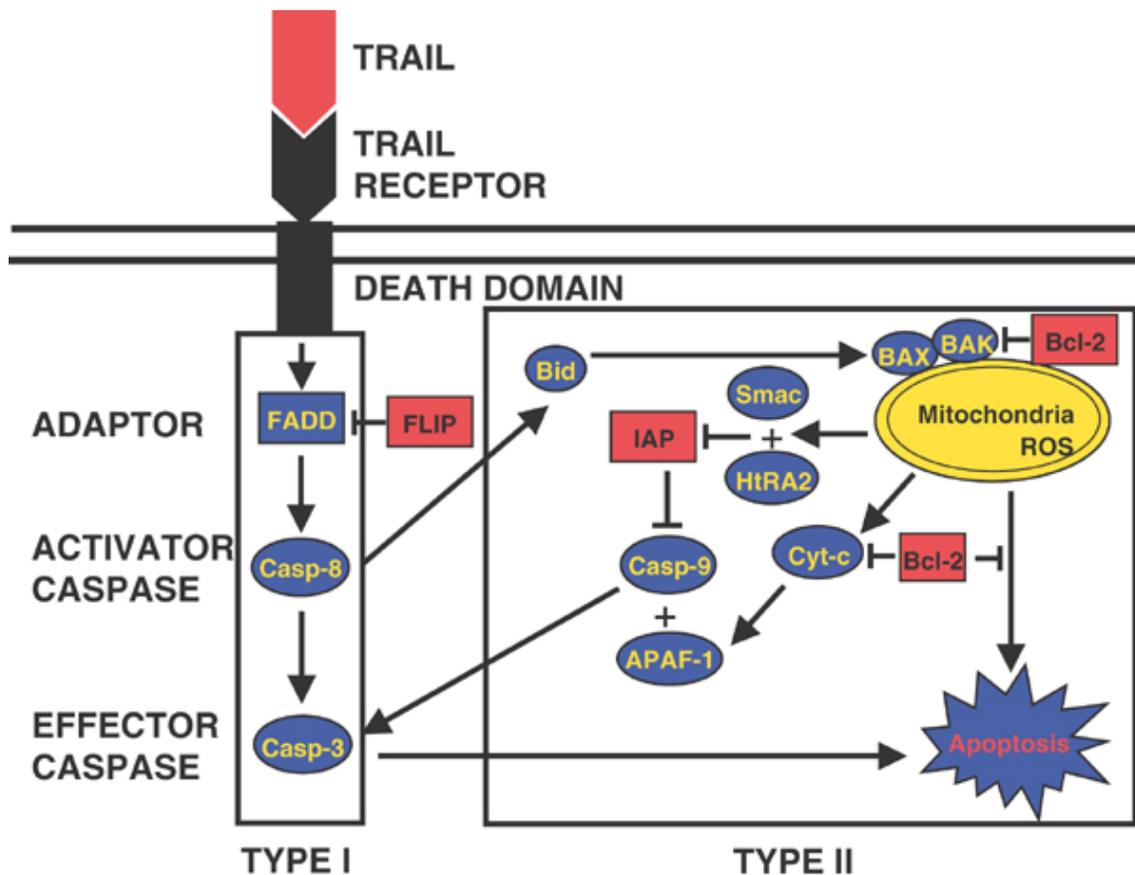
Studi sull'apoptosi indotta da Fas hanno evidenziato che il contributo della via estrinseca piuttosto che della via mitocondriale può essere esemplificato con due modelli cellulari principali:

- *Cellule di tipo I*: in seguito all'occupazione dei recettori di morte, l'attivazione della caspasi-8 è sufficiente ad indurre l'apoptosi. In queste cellule la formazione di un robusto complesso DISC e la processazione della caspasi-8 si ritiene attivino direttamente la caspasi-3 e le caspasi effettrici, inducendo la morte cellulare nonostante il mancato coinvolgimento del sistema intrinseco mitocondriale. Questa fase è indipendente dal mitocondrio e non viene inibita da una over-espressione di Bcl-2.
- *Cellule di tipo II*: la morte cellulare dipende strettamente dalla via mitocondriale quindi una over-espressione di Bcl-2 non permette una risposta di tipo apoptotico in seguito all'attivazione della via estrinseca.

Secondo tali studi, a livello molecolare questi due tipi cellulari differiscono nella quantità di caspasi-8 reclutata da Fas mediante FADD per la formazione del complesso DISC: mentre il tipo I effettivamente attiva la caspasi-8 reclutata per la formazione di DISC, nel tipo II ciò non avviene e quindi è necessario l'intervento della via mitocondriale

per andare effettivamente incontro a morte cellulare. Il rilascio del citocromo *c* avviene in entrambi i casi anche se nelle cellule di tipo I non è indispensabile.

Nel caso di TRAIL la risposta apoptotica non è necessariamente riconducibile al modello di tipo I o II descritti per Fas, comunque anche per questo fattore apoptotico ci si può riferire a questi sistemi (Wang & El-Deiry, *Oncogene* 2003) (**Figura 22**).



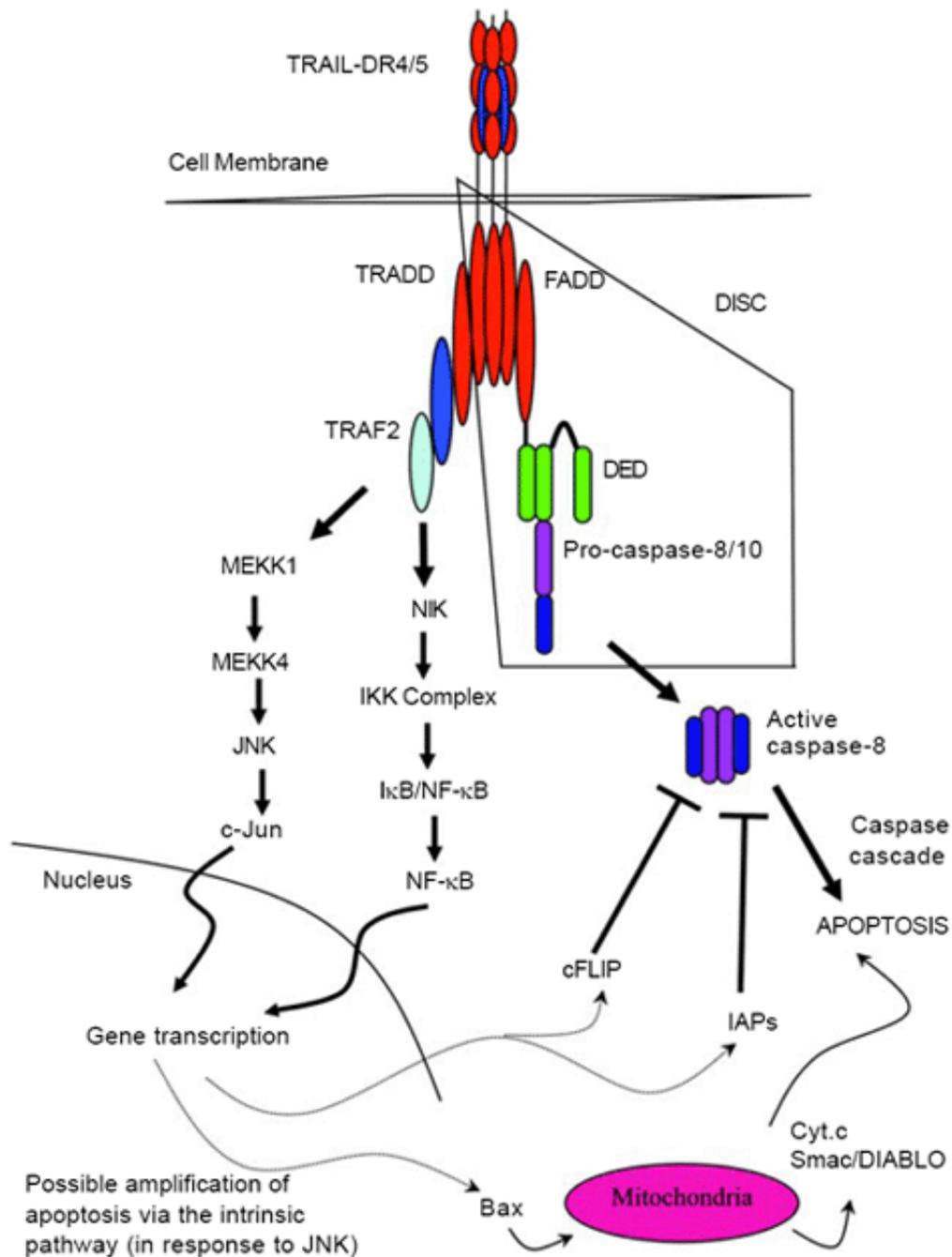
Adattata da Wang & El-Deiry, *Oncogene* 2003

Figura 22. Vie di segnalazione apoptotica indotta da TRAIL. Il legame di TRAIL e la trimerizzazione dei recettori di morte porta al reclutamento di FADD, molecola adattatrice che attiva la caspasi-8. FLIP interferisce con l'attivazione della caspasi-8. In alcune cellule (**tipo I**) l'attivazione della caspasi-8 è sufficiente per indurre apoptosi, mentre in altre cellule (**tipo II**) è necessaria l'amplificazione della via estrinseca mediante l'interazione con la via intrinseca per indurre l'apoptosi. Il clivaggio di Bid, tramite la caspasi-8, e la sua traslocazione nei mitocondri funge da punto di legame per la connessione fra le due vie apoptotiche.

Molti studi dimostrano inoltre che TRAIL può essere coinvolto non solo nella via di segnalazione apoptotica caspasi-dipendente ma anche in vie alternative che promuovono invece l'effetto opposto, cioè inducono sopravvivenza cellulare. Il legame di TRAIL ai recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 può infatti attivare la via di segnalazione di NF- κ B, un fattore di trascrizione che induce la trascrizione di geni anti-apoptotici, o la via di segnalazione di JNK1 che attiva il fattore di trascrizione c-Jun, che invece può indurre la trascrizione sia di geni antiapoptotici che proapoptotici.

Infatti, TRAIL non modula significativamente la sopravvivenza dei precursori MK (Zamai et al., *Blood* 2000): al contrario, recentemente TRAIL è stato proposto come un promotore della maturazione MK (Melloni et al., *J Cell Physiol* 2005). A questo riguardo, è da notare che de Botton e collaboratori hanno dimostrato che l'attivazione delle caspasi è fondamentale per la formazione di propiastri, mostrando un'attivazione localizzata della caspasi-3 senza la presenza di frammentazione del DNA (de Botton et al., *Blood* 2002).

Resta comunque evidente che la via apoptotica rappresenta l'effetto primario del legame TRAIL al suo recettore (Kimberley & Screaton, *Cell Res* 2004) (**Figura 23**).



Adattata da Kimberley & Screaton, *Cell Res* 2004

Figura 23: Vie di segnalazione in cui può essere coinvolto TRAIL oltre alla cascata apoptotica. Nello schema sono riportate le principali vie di segnale attivate in seguito al legame di TRAIL a DR4 o DR5. La principale riguarda l'induzione dell'apoptosi. Comunque, è possibile anche l'attivazione di NF-κB e c-Jun. Questi fattori di trascrizione possono avere un effetto antiapoptotico mediante l'up-regolazione di geni che favoriscono la sopravvivenza cellulare, oppure possono amplificare il segnale apoptotico inducendo la trascrizione di geni che possono agire attraverso i mitocondri (via intrinseca).

SCOPO DELLA TESI

L'Apoptosi svolge un ruolo essenziale nella regolazione del numero di cellule staminali ematopoietiche come anche nel processo di differenziamento cellulare lungo le diverse filiere ematopoietiche. TRAIL è un membro della famiglia di citochine TNF con un noto ruolo di induzione dell'apoptosi in numerose cellule tumorali ed un ruolo emergente nella modulazione della normale ematopoiesi. Abbiamo sviluppato l'ipotesi che PKC ϵ possa agire come uno "switch" nella risposta cellulare agli effetti di TRAIL durante l'eritropoiesi.

Abbiamo dimostrato che cellule CD34 differenziate con EPO sono insensibili all'effetto apoptogeno di TRAIL al giorno 0, poiché non esprimono sulla superficie i recettori specifici. Dal giorno 3 in poi le cellule eritroidi esprimono sulla superficie cellulare i recettori di morte ed incominciano ad essere sensibili all'effetto di TRAIL sino al giorno 7/8 quando, nonostante la presenza dei recettori, EPO induce l'espressione intracellulare di PKC ϵ che rende le cellule in via di differenziamento resistenti a TRAIL, probabilmente attraverso l'induzione dell'espressione di Bcl-2. La nostra conclusione è che in cellule CD34 umane EPO promuove una serie di eventi che, con una cinetica finemente regolata, riducono la sensibilità di queste cellule a TRAIL ad un periodo di tempo specifico, definibile come una "finestra di sensibilità a TRAIL" per la regolazione negativa del numero di cellule eritroidi.

La PKC ϵ non svolge un ruolo solo nel differenziamento eritroide, ma anche nella prime fasi della definizione della filiera megacariocitaria (MK). Abbiamo ipotizzato che i livelli di espressione della PKC ϵ possano essere modulati durante il differenziamento MK, con uno specifico ruolo nella trombopoiesi sia nelle sue fasi precoci che in quelle tardive.

Abbiamo dimostrato che, diversamente dal differenziamento eritroide, PKC ϵ è completamente down-modulata nel differenziamento MK in cellule CD34 trattate con TPO per almeno 6 giorni. L'espressione forzata di PKC ϵ durante la fase tardiva del differenziamento MK interferisce con la differenziazione fenotipica dei progenitori, probabilmente attraverso l'up-regolazione dei livelli Bcl-xL. TRAIL, che è un regolatore negativo dell'espansione eritroide, non svolge un'azione apoptogena su cellule CD34 trattate con TPO, ma al contrario ne favorisce il differenziamento. Comunque, i livelli di PKC ϵ interferiscono negativamente anche con gli effetti di TRAIL durante il differenziamento MK.

Date queste osservazioni, PKC ϵ può essere considerato un intermedio nella via di segnalazione differenziativa, la cui espressione deve essere finemente regolata, con una cinetica opposta nelle filiere eritroide e megacariocitaria.

MATERIALI E METODI

Purificazione delle cellule CD34⁺

Cellule CD34⁺ primarie sono state isolate da midollo osseo di donatore sano mediante una selezione immunomagnetica positiva. A tale scopo è stato utilizzato il kit di isolamento per cellule CD34⁺ (Milteny Biotech, Gladbach, Germany) in un campo magnetico costituito dall'apparato Vario-MACS (Milteny Biotech), secondo le indicazioni della ditta produttrice. In breve, le cellule mononucleate totali sono state separate mediante centrifugazione a gradiente Ficoll-Hypaque. Queste sono poi state marcate con un mAb anti-CD34 coniugato a microbiglie MACS. Le cellule marcate magneticamente sono state quindi bloccate in una colonna adeguata al numero di cellule totali (colonna MS o CS; Milteny Biotech) nel campo magnetico di un Vario-MACS. La purezza delle cellule CD34⁺ è stata subito valutata, in citometria a flusso, mediante la marcatura di una piccola aliquota del campione ottenuto con un mAb anti-CD34-PE (Immunotech, Beckman Coulter, Miami, FL). Solo campioni con una purezza maggiore al 95% sono stati utilizzati per i successivi esperimenti.

Colture cellulari e trattamenti

Cellule CD34⁺ umane purificate sono state mantenute in coltura sino a 18-20 giorni, ad una densità ottimale di 1×10^6 cell/ml, in terreno X-vivo privo di siero e supplementato con 3ng/ml di IL-3 umana ricombinante e 40ng/ml di SCF umano ricombinante, in presenza o assenza (controllo) di 5U/ml di EPO e 100 ng/ml di TPO. Le cellule sono state riseminate in terreno nuovo completo di citochine ogni 3 giorni.

Le linee cellulari HeL, K562 e TF-1 sono state mantenute in terreno RPMI arricchito con 10% di FBS ad una densità ottimale di 0.5×10^6 cells/ml. Le cellule TF-1 sono state mantenute in presenza di 3 ng/ml di IL-3.

Tutte le citochine utilizzate sono della ditta PeproTech (London, UK).

Come inibitore della PKC ϵ abbiamo utilizzato l'inibitore della traslocazione H-glu-Ala-Val-Ser-Leu-Lys-Pro-Thr-OH (Calbiochem) ad una concentrazione pari a 250 μ g/ml per 48 ore.

Morfologia cellulare

La morfologia cellulare è stata analizzata per mezzo di un microscopio ottico ai giorni 5 e 15 di coltura. Aliquote di circa 30.000 cellule sono state centrifugate su vetrino portaoggetti mediante un StatSpin CytoFuge (StatSpin, Norwood, MA) a 600 rpm per 4 min. I preparati ottenuti sono stati fissati, colorati con ematossilina/eosina ed esaminati con un microscopio digitale Coolscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Analisi in citometria a flusso

Per verificare il differenziamento in senso eritroide e megacariocitario, aliquote di 0.3×10^6 cellule/per ogni punto sperimentale sono state marcate con i seguenti mAb: anti-CD61 (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) coniugato con R-ficoeritrina (RPE), anti-CD41 (Chemicon, Temecula, CA) coniugato con RPE, anti-CD42b e anti-CD71 (Pharmingen) coniugati con Cianina-5 (Cy5), anti-Glicoforina A (DAKO, Glostrup, Denmark) coniugata con RPE, anti-CD14 or anti-CD15 (Exalpha Corporation, Boston, Massachusetts, USA) coniugati con fluorescina isotiocianato (FITC). La diluizione di ogni anticorpo utilizzato è stata ottimizzata mediante un test di diluizioni seriali.

In alcuni esperimenti, aliquote di 0.3×10^6 cellule/per ogni punto sperimentale sono state marcate con un pannello di mAb anti-TRAIL-R (Alexis Biochemical, San Diego, CA). L'espressione di TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 e TRAIL-R4 è stata analizzata mediante una marcatura indiretta utilizzando 1 μ g dei seguenti mAb: HS101 anti-TRAIL-R1 umano, HS201 anti-TRAIL-R2 umano, HS301 anti-TRAIL-R3 umano e HS401 anti-

TRAIL-R4 umano, ed in seguito è stato utilizzato un anticorpo, sviluppato in capra contro le IgG di topo (Immunotech), coniugato con RPE, come reagente secondario.

In alcuni esperimenti è stato calcolato il numero assoluto degli antigeni espressi sulla superficie di ogni singola cellula. A questo scopo, il citometro a flusso è stato calibrato con un gruppo di biglie standard (DAKO) ciascuna con una quantità nota di fluorocromo (FITC, PE o Cy5) espresso come unità di MESF. In seguito è stata costruita una curva di calibrazione ottenuta intersecando i valori di MESF delle biglie e i valori medi del canale nel quale appariva il picco (Schwartz et al., *Cytometry* 1996).

Le analisi dei campioni sono state effettuate mediante un citometro a flusso Epics XL (Beckman Coulter) ed un programma Expo ADC (Beckman Coulter).

Disegno degli siRNA e trasfezione

Sono stati disegnati specifici “double-strand” siRNAs (dsRNA) per riconoscere le sequenze corrispondenti ai nucleotidi 223-244, 429-450, 942-963 e 1158-1179 dell’ mRNA di PKC ϵ umana (NM005400). Le sequenze bersaglio sono: 5'-AAGAT CAAAA TCTGC GAGGCC-3', 5'-AAGAT CGAGC TGGCTG TCTTT-3', 5'-AACTA CAAGG TCCCT ACCTTC-3', 5'-AAAAA GCTCA TTGCT GGTGCC-3'.

Le rispettive sequenze di RNA senso e antisense sono state sintetizzate mediante un Silencer siRNA Construction Kit (Ambion, Austin, Texas) (Mirandola et al., *Blood* 2004). Sono stati preparati anche degli siRNA non specifici di controllo, contenenti gli stessi nucleotidi con sequenza irregolare (scrambled PKC ϵ siRNA), secondo le indicazioni della ditta produttrice.

Il plasmide che esprime GFP-PKC ϵ e quello di controllo sono stati ottenuti dal Prof. Peter Parker (Cancer Research UK, London Research Institute). Sia il plasmide contenente PKC ϵ che quello contenente la PKC ϵ mutata in K552M sono stati clonati nel vettore pCDNA3.1 fuso con la GFP (Ivaska et al., *EMBO J* 2002).

Per ottenere la massima efficienza di trasfezione degli siRNA (100 nM ciascuno) e dei plasmidi GFP-PKC ϵ (1 μ g/trasfezione) è stato utilizzato il sistema Amaxa nucleofection technology™ (Amaxa, Koeln, Germany), in accordo coi protocolli forniti dal produttore.

PKC ϵ è stata over-espressa in progenitori MK primari al giorno 8 di coltura.

Analisi semiquantitative della trascrizione

L'RNA totale è stato isolato mediante il RNeasy mini kit (Qiagen). Un μg di RNA totale è stato retrotrascritto con MMV reverse transcriptase e diluizioni progressive (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) sono state utilizzate per amplificazioni con PCR per valutare il cDNA della β -actina e della PKC ϵ .

La PCR è stata eseguita alle seguenti condizioni di reazione: 95 °C per 30 sec, 56 °C per 30 sec, 72 °C per 30 sec e una estensione finale a 72 °C per 5 min, utilizzando 35 cicli di amplificazione. Le sequenze dei primer utilizzati per la PCR sono: β -actina: 5'-TGACG GGGTC ACCCA CACTG TGCCC ATCTA-3' (senso) e 5'-CTAGA AGCAT TTGCG GTGGA CGATG GAGGG-3' (antisenso); PKC ϵ : 5'-CAATGGC CTTCTTAAG ATCAAAA-3' (senso) e 5'-CCTGA GAGATC GATGATC ACATAC-3' (antisenso).

Western blot

Le cellule in coltura sono state contate e 2×10^6 cellule sono state raccolte a tempi specifici, lavate in PBS e centrifugate a 200g per 10 min. I pellet sono stati risospesi in un tampone di lisi cellulare (50mM Tris-HCl, pH7.4; 1% NP-40; 0.25% sodium deoxycholate; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM PMSF; 1mM Na_3VO_4 ; 1mM NaF) contenente gli inibitori delle proteasi ed in seguito è stata valutata la concentrazione proteica utilizzando il BCATM protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Su di un gel di SDS-acrylamide al 5% sono state migrate 14 μg di proteine per ogni campione e poi trasferite su un filtro di nitrocellulosa. Le membrane di nitrocellulosa contenenti le proteine sono state bloccate ed incubate con un anticorpo primario specifico, seguendo le indicazioni del produttore. In particolare, anticorpi policlonali anti-PKC ϵ e anti-fosfo-PKC ϵ (Upstate, Lake Placid, NY) sono stati utilizzati ad una concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. I mAbs anti-PKC δ (Becton Dickinson), anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti- β -actina e anti- β -tubulina (Sigma) sono stati diluiti rispettivamente 1:500, 1:50, 1:5000 e 1:20000, mentre gli anticorpi policlonali anti-Bax e anti-Bcl-xL (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) sono stati diluiti 1:1000.

Le membrane, in seguito all'incubazione con l'anticorpo primario, sono state lavate ed incubate nuovamente con un anticorpo secondario diretto contro le IgG di topo (1:2000)

o di coniglio (1:5000) (Pierce) coniugato con la perossidasi per 1.5 ore a temperatura ambiente. La specifica reazione è stata evidenziata mediante il sistema di rivelazione ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Valutazione dell'apoptosi

La vitalità cellulare è stata valutata mediante la colorazione con tripan blu. Le cellule apoptotiche sono state identificate in citometria a flusso sia come picchi sub-diploidi generati dalla frammentazione di DNA sia mediante l'incubazione con Annessina V/PI. In particolare, le cellule sono state permeabilizzate, in presenza di RNasi H, con etanolo ed incubate con 50 µg/ml di PI. La fosfatidilserina è stata marcata mediante Annessina V coniugata con FITC (ACTIPLATE, Valter Occhiena, Torino, Italy) in un tampone contenente Ca²⁺ e PI, secondo le indicazioni del produttore.

RISULTATI

PKC ϵ controlla la sensibilita' a TRAIL in progenitori eritroidi

L'Apoptosi svolge un ruolo essenziale nella regolazione del numero di cellule staminali ematopoietiche come anche nel processo di differenziamento cellulare lungo le diverse filiere ematopoietiche. TRAIL è un membro della famiglia di citochine TNF con un noto ruolo di induzione dell'apoptosi in numerose cellule tumorali ed un ruolo emergente nella modulazione della normale ematopoiesi. Abbiamo sviluppato l'ipotesi che PKC ϵ possa agire come uno "switch" nella risposta cellulare agli effetti di TRAIL durante l'eritropoiesi.

Abbiamo dimostrato che cellule CD34 differenziate con EPO sono insensibili all'effetto apoptogeno di TRAIL al giorno 0, poiché non esprimono sulla superficie i recettori specifici. Dal giorno 3 in poi le cellule eritroidi esprimono sulla superficie cellulare i recettori di morte ed incominciano ad essere sensibili all'effetto di TRAIL sino al giorno 7/8 quando, nonostante la presenza dei recettori, EPO induce l'espressione intracellulare di PKC ϵ che rende le cellule in via di differenziamento resistenti a TRAIL, probabilmente attraverso l'induzione dell'espressione di Bcl-2. La nostra conclusione è che in cellule CD34 umane EPO promuove una serie di eventi che, con una cinetica finemente regolata, riducono la sensibilità di queste cellule a TRAIL ad un periodo di tempo specifico, definibile come una "finestra di sensibilità a TRAIL" per la regolazione negative del numero di cellule eritroidi.

TRAIL induce apoptosi in cellule eritromieloidi

Le linee cellulari eritromieloidi HeL, K562 e TF-1 esprimono sulla superficie cellulare la Glicoforina A a diversi livelli. L'analisi del fenotipo con mAbs anti- TRAIL-R ha evidenziato che tutte e tre le linee cellulari esprimono i diversi recettori, con una chiara prevalenza per i recettori di morte R1 e R2 in cellule HeL e K562, ed una minore espressione di R2 in cellule TF-1 (**Figura 24A**). In seguito a 48 ore di trattamento con 50 ng/ml di TRAIL, in tutte le linee cellulari è stata indotta l'apoptosi (HeL: 52.3 % \pm 9.1; K562: 49.6 % \pm 5.0; TF-1: 50.2% \pm 9.1 I valori sono espressi come la media della percentuale delle cellule Annessina V⁺ \pm DS di tre diversi esperimenti), come evidenziato in citometria a flusso dall'analisi delle cellule marcate con Annessina V-FITC / PI (**Figura 24B**).

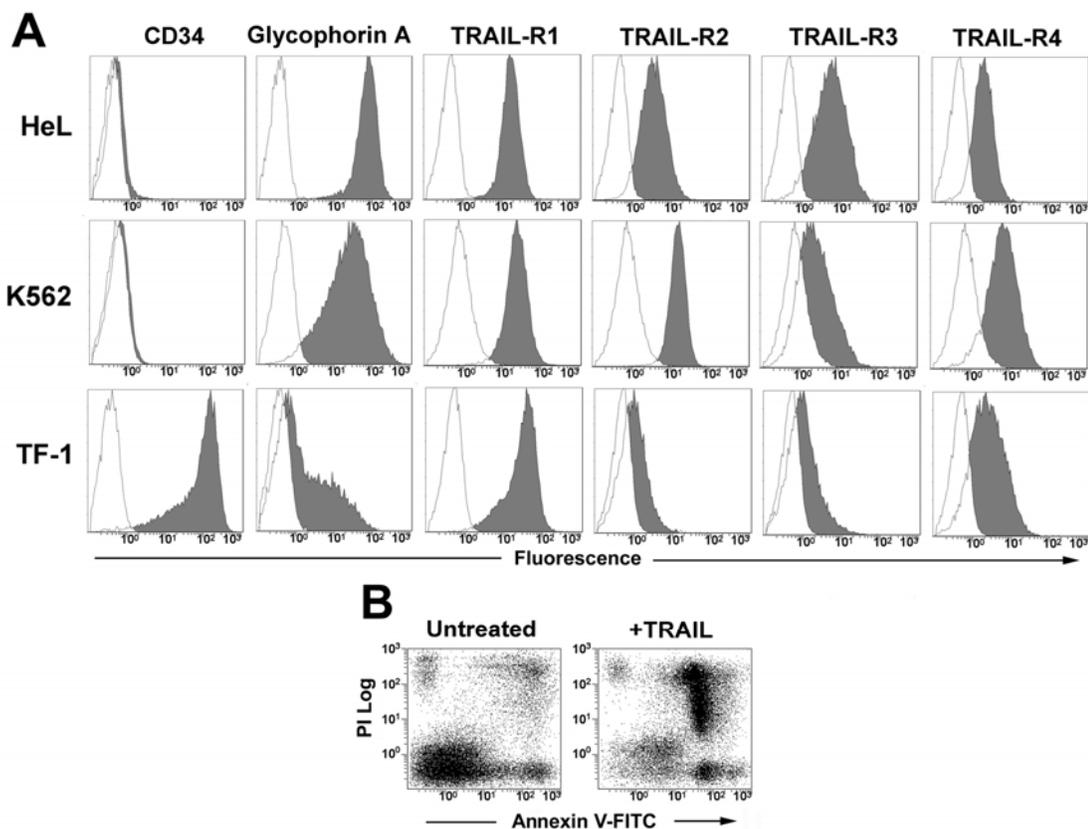


Figura 24. Fenotipo delle linee cellulari eritroleucemiche e loro sensibilità a TRAIL.

Pannello A: le cellule HeL, K562 e TF-1 sono state incubate con anticorpi anti-CD34, anti-Glicoforina A, anti-TRAIL-R1, -R2, -R3, -R4, come descritto nei *Materiali e Metodi*. L'istogramma della fluorescenza specifica (grigio) è stato sovrapposto al controllo negativo (istogramma vuoto).

Pannello B: apoptosi TRAIL-indotta di cellule TF-1 trattate per 48 ore con 50 ng/ml di TRAIL. L'Apoptosi è stata valutata incubando le cellule con Annessina V-FITC e PI.

PKC ϵ riduce l'apoptosi mediata da TRAIL in cellule eritromieloidi

Sulla base degli effetti di pro-sopravvivenza noti di PKC ϵ in cellule TF-1 (Gubina et al., *Blood* 1998) e della sua capacità di protezione dall'apoptosi indotta da TRAIL in cellule gliari (Shinohara et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2001), abbiamo effettuato una serie di esperimenti per verificare se PKC ϵ possa modulare la sensibilità delle linee cellulari eritromieloidi all'effetto apoptogeno di TRAIL. A questo proposito, abbiamo in un primo momento over-espresso PKC ϵ in queste linee cellulari, utilizzando come controllo negativo una PKC ϵ mutata in K522M (PKC ϵ_m) (Ivaska et al., *EMBO J* 2002). Come mostrato in **Figura 25A**, sia PKC ϵ che PKC ϵ_m possono essere efficacemente over-espresse nelle tre linee cellulari ed entrambe possono essere fosforilate, come evidenziato mediante immunoblot con l'anticorpo anti-phospho-PKC ϵ . Poichè l'over-espressione di PKC ϵ non modifica quella dei TRAIL-R sulla superficie delle tre linee cellulari (**Figura 25B**), abbiamo trattato K562, HeL and TF-1 trasfettate con 50 ng/ml TRAIL per 48 ore. La **Figura 25C** mostra una riduzione significativa dell'apoptosi TRAIL-indotta in tutte e tre le linee cellulari che over-esprimono PKC ϵ , ma non PKC ϵ_m .

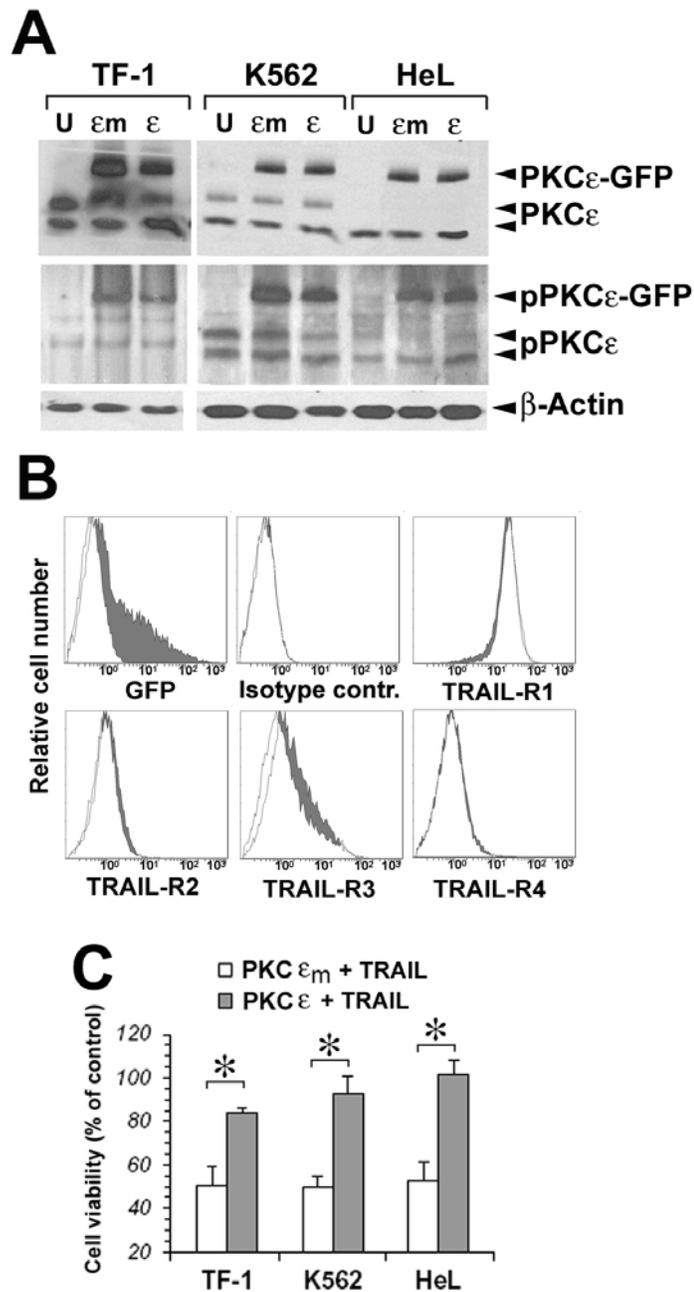


Figura 25. Tasfezione di PKC ϵ e PKC ϵ_m in linee cellulari eritroleucemiche.

Pannello A: analisi dell'espressione delle proteine PKC ϵ -GFP esogena e PKC ϵ endogena mediante Western Blot. La PKC ϵ fosforilata (pPKC ϵ) è stata rivelata utilizzando un anticorpo specifico anti-phospho-Ser729, nella porzione C-terminale. La β -actina è stata valutata come controllo di concentrazione proteica.

Pannello B: espressione sulla superficie cellulare dei TRAIL-R in seguito a trasfezione di PKC ϵ . Le cellule TF-1 sono state trasfettate con PKC ϵ -GFP (istogramma grigio) o con PKC ϵ_m -GFP (istogramma vuoto), e l'espressione dei TRAIL-R è stata valutata 48 ore dopo in citometria a flusso.

Pannello C: PKC ϵ reduce la sensibilità delle linee cellulari eritroleucemiche all'apoptosi indotta da TRAIL. K562, HeL e TF-1 sono state trasfettate con PKC ϵ (barra grigia) o con PKC ϵ_m (barra vuota) e dopo 48 ore sono state trattate con 50ng/ml di TRAIL. La vitalità cellulare residua è stata analizzata in citometria a flusso mediante la marcatura con Annexina V-FITC e PI. E' stata riportata la media di tre esperimenti indipendenti come percentuale rispetto al controllo. (* P<0.05).

TRAIL induce l'apoptosi di eritroblasti derivanti da cellule CD34

Cellule CD34 purificate da sangue periferico umano sono state valutate per l'espressione dei TRAIL-R sulla loro superficie. La **Figura 26** mostra che nessuno dei quattro TRAIL-R è espresso su cellule CD34 appena purificate. Comunque, a partire dal giorno 3 di coltura – in terreno privo di siero e addizionato con IL-3, SCF ed EPO – le cellule CD34 presentano un incremento progressivo dell'espressione di superficie di TRAIL-R1 e R2. Al contrario, i recettori decoy di TRAIL non sono mai espressi, con l'eccezione di -R4 che è presente in modo transiente intorno al giorno 13. Concordemente a queste osservazioni, quando TRAIL è stato aggiunto a cellule CD34 trattate con EPO, queste risultavano resistenti al giorno 0 e dal giorno 3 in poi diventavano sensibili all'effetto apoptogeno di TRAIL (**Figura 27A-B**). Sorprendentemente, nonostante l'espressione costante dei recettori di morte di TRAIL sulla superficie cellulare (e dell'assenza dei recettori decoy), la sensibilità a TRAIL di cellule CD34 differenziate con EPO ha incominciato a diminuire progressivamente dal giorno 7, e dal giorno 10 gli eritroblasti sono diventati resistenti a TRAIL (**Figura 27B**). Colture di controllo di cellule CD34 purificate e mantenute in assenza di EPO sono sempre resistenti all'effetto apoptogeno di TRAIL (**Figura 27C**), confermando che la sensibilità a TRAIL delle cellule CD34 tra i giorni 3 e 7 era EPO-dipendente.

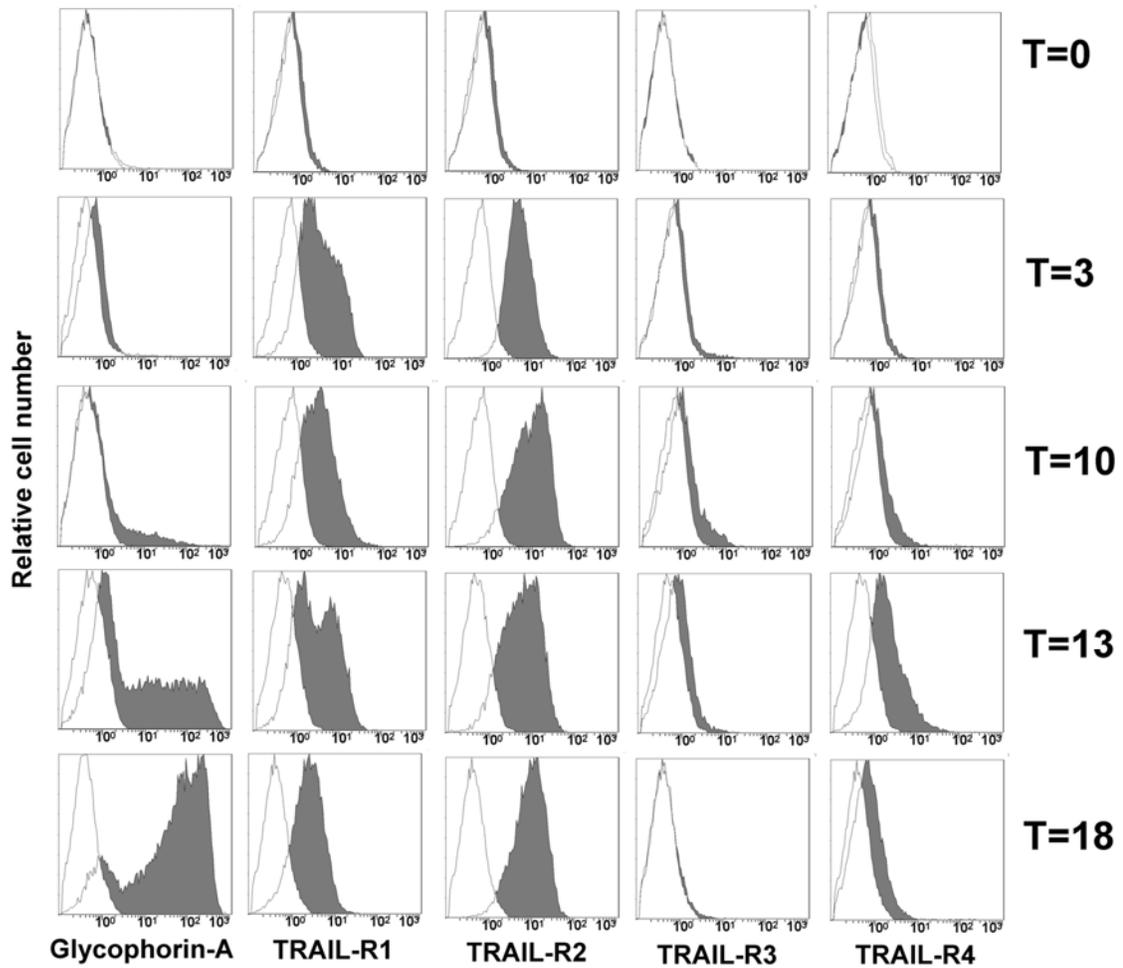


Figura 26. Espressione dei TRAIL-R di eritroblasti derivanti da cellule CD34.

Cellule CD34 purificate sono state mantenute in coltura per 18 giorni in terreno privo di siero e addizionato con EPO, SCF e IL-3, mostrando un'espressione progressiva di Glicoforina A. Agli intervalli di tempo indicati (T = giorni), l'espressione dei TRAIL-Rs è stata valutata mediante marcatura con mAbs specifici. Istogramma grigio: fluorescenza specifica; istogramma vuoto: controllo negativo.

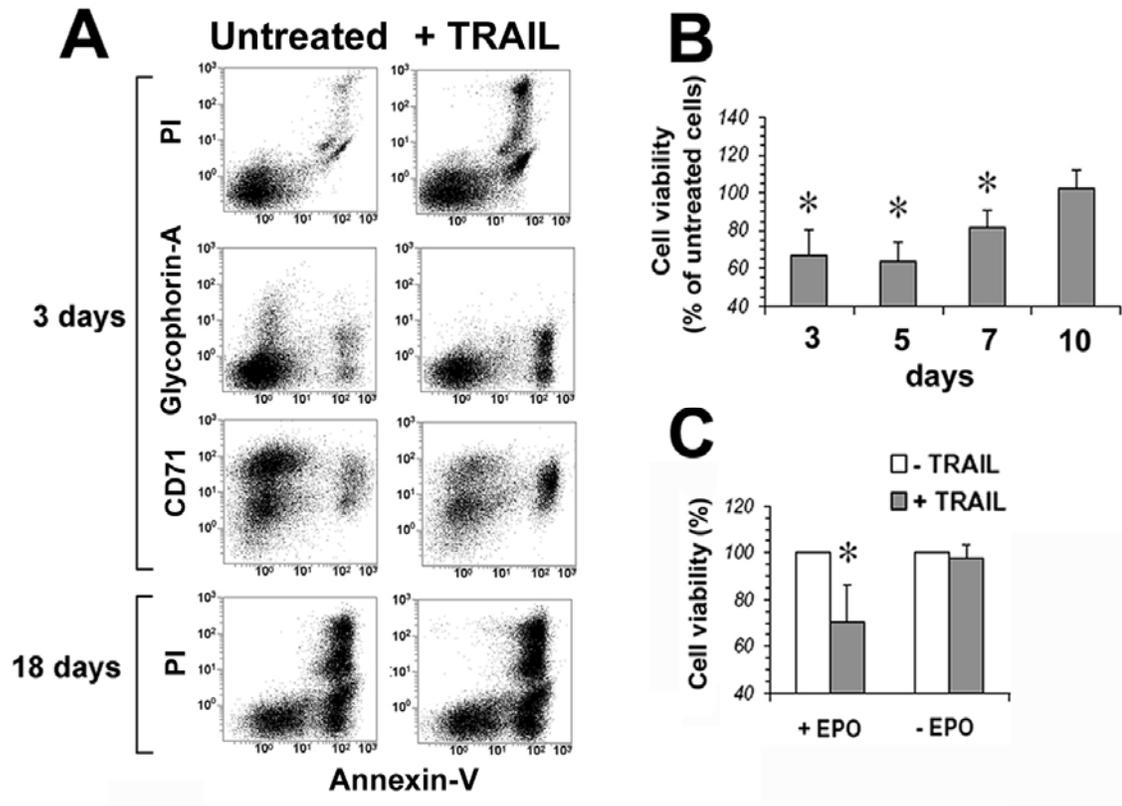


Figura 27. TRAIL uccide le cellule CD34 trattate con EPO.

Pannello A: analisi in citometria a flusso di cellule CD34 al giorno 3 e al giorno 18 di coltura (EPO, SCF e IL-3) trattate con 50ng/ml di TRAIL per 48 ore: la rimanente vitalità cellulare è stata valutata marcando le cellule con Annessina V-FITC e PI, mentre la differenziazione cellulare è stata seguita analizzando l'espressione di Glicoforina A e CD71-Cy5.

Pannello B: sensibilità degli eritroblasti derivanti da CD34 all'apoptosi indotta da TRAIL. Agli intervalli di tempo indicati le cellule sono state trattate per 48 ore con 50ng/ml di TRAIL e la percentuale della vitalità cellulare è stata valutata marcando le cellule con Annessina V-FITC e PI. Ciascun istogramma è la media di 3 esperimenti indipendenti espressa come percentuale rispetto al controllo (cellule CD34 in assenza di TRAIL). (* P<0.05).

Pannello C: sensibilità a TRAIL di cellule CD34 mantenute in coltura per 3 giorni con IL-3, SCF, in terreno privo di siero, in presenza (+EPO) o assenza di EPO (-EPO). I valori sono espressi come la percentuale delle cellule non trattate con TRAIL (3 esperimenti indipendenti, * P<0.05).

EPO up-regola PKC ϵ che induce resistenza a TRAIL

Ci siamo quindi chiesti se PKC ϵ poteva essere implicata nella resistenza a TRAIL osservata negli eritroblasti dal giorno 10 in poi. La **Figura 28A-B** mostra la cinetica di induzione della PKC ϵ in colture cellulari di CD34 primarie trattate in presenza o assenza di EPO.

Per verificare che l'induzione di PKC ϵ in eritroblasti cresciuti in presenza di EPO fosse responsabile della loro resistenza a TRAIL, abbiamo inibito la PKC ϵ farmacologicamente con l'inibitore selettivo per la sua traslocazione (Bassini et al., *Blood* 1999; Zamai et al., *Blood* 2000). La **Figura 28C** mostra che l'inibizione di PKC ϵ aumenta la morte cellulare TRAIL-indotta sia nelle linee cellulari che in cellule CD34 al giorno 10 di differenziamento. In seguito, abbiamo disegnato e trasfettato in cellule HeL e K562 siRNA diretti contro l'mRNA per PKC ϵ . In **Figura 28D** è riportata l'analisi della RT-PCR semiquantitativa di cellule HeL trattate con anti-PKC ϵ siRNA, che mostra una diminuzione >100 volte dell'amplificazione dello specifico cDNA. L'inibizione della sintesi proteica della PKC ϵ dovuta all'utilizzo di siRNA specifici (**Figura 28E**) sensibilizza sia le cellule HeL che K562 all'apoptosi indotta da TRAIL (**Figura 28F**). In fine, abbiamo over-espresso PKC ϵ in cellule CD34 differenziate con EPO per 3 giorni, osservando che queste acquisivano resistenza all'effetto apoptogeno di TRAIL, al contrario delle cellule CD34 trasfettate con PKC ϵ_m (**Figura 28G**).

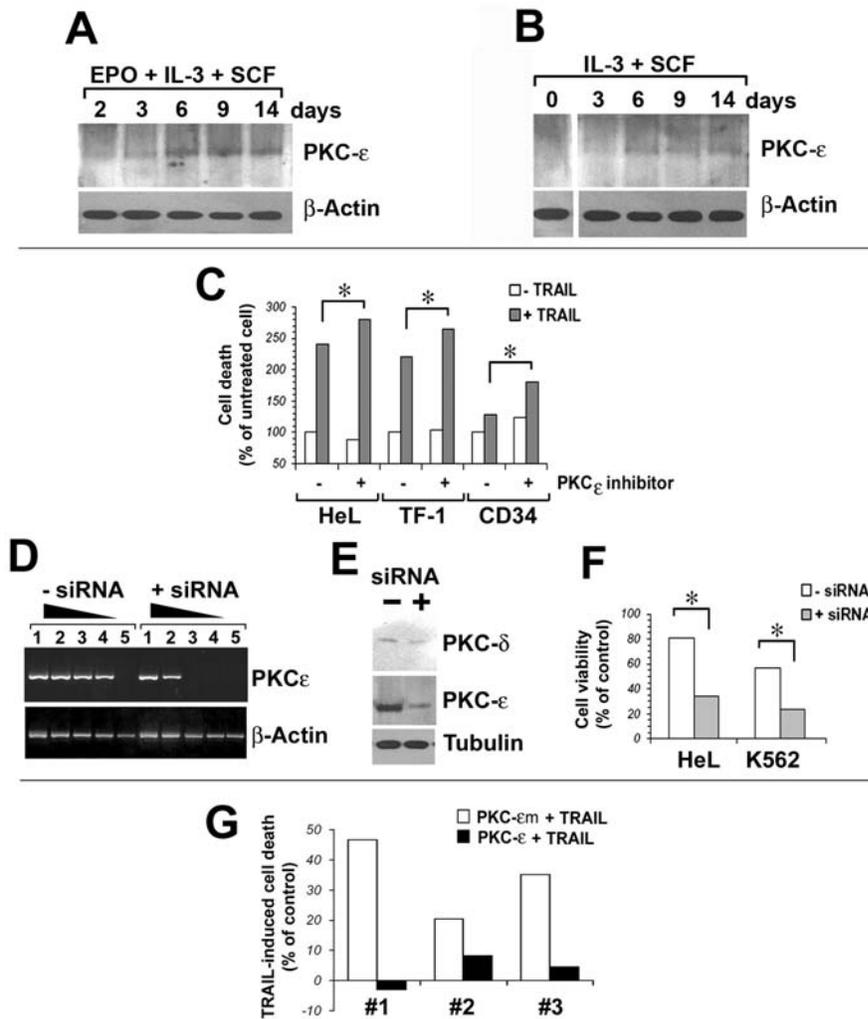


Figura 28. Induzione di PKCε e suo effetto sull'apoptosi TRAIL-indotta in eritroblasti umani.

Pannello A e B: analisi in western blot della proteina PKCε totale in cellule CD34 coltivate in terreno privo di siero ed addizionato con le citochine indicate. La β-actina è stata valutata come controllo di concentrazione proteica.

Pannello C: apoptosi indotta da TRAIL in cellule pre-trattate per 48 ore con 250μg/ml di inibitore della PKCε (+) o con un peptide di controllo (-). La morte cellulare è espressa come percentuale rispetto al controllo.

Pannello D: analisi mediante RT-PCR semi-quantitativa dell'espressione residua di mRNA per PKCε dopo la trasfezione con PKCε-siRNA. L'RNA è stato isolato 48 ore dopo la trasfezione con siRNA. I campioni nei pozzetti da 1 a 5: PCR da cDNA totale, ottenuto da 1μg di RNA totale retrotrascritto, diluito da 10^{-1} a 10^{-5} .

Pannello E: analisi in western blot dell'espressione residua della proteina PKCε dopo la trasfezione di PKCε-siRNA. PKC-δ è stata utilizzata come controllo per la specificità di PKCε-siRNA.

Pannello F: la trasfezione di PKCε-siRNA aumenta la sensibilità cellulare a TRAIL. La vitalità cellulare residua delle linee cellulari HeL e K562 trattate con PKCε-siRNA e con TRAIL è riportata come percentuale rispetto al controllo (campioni in assenza di TRAIL). E' presentata la media di 3 esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$.

Pannello G: l'over-espressione di PKCε riduce la sensibilità a TRAIL degli eritroblasti derivati da CD34. Le cellule CD34, isolate da 3 donatori non correlati e mantenute con IL-3, SCF e EPO per 24 ore, sono state trasfettate con GFP-PKCε o GFP-PKCεm. Dopo 48 ore le cellule sono state trattate con 50ng/ml di TRAIL. L'apoptosi è stata valutata 48 ore dopo il trattamento con TRAIL, mediante marcatura con Annessina V-FITC e PI. La morte cellulare indotta da TRAIL è stata riportata come percentuale rispetto al controllo.

PKC ϵ modula i livelli di Bcl-2 nei progenitori eritroidi

Dal momento che l'attivazione generica della PKC indotta da PMA non interferisce con l'associazione dei TRAIL-R sulla superficie cellulare (Harper et al., *J Biol Chem* 2003), e che l'over-expression di PKC ϵ non modula la densità superficiale dei TRAIL-R, abbiamo ritenuto che i livelli di Bcl-2 potessero essere un fattore anti-apoptotico coinvolto nella protezione delle cellule progenitrici eritroidi.

Gli esperimenti sugli eritroblasti derivati da CD34 primarie sono riportati nella **Figura 29A**. L'analisi della cinetica dell'espressione di Bcl-2 durante il differenziamento eritroide indotto da EPO ha dimostrato una up-regolazione dell'espressione al giorno 14, mentre i livelli di Bax rimangono costanti.

Poiché è stato ben dimostrato precedentemente che i livelli di Bcl-2 possono essere modulati da PKC ϵ (Gubina et al., *Blood* 1998), abbiamo sia inibito che over-espesso PKC ϵ nelle nostre linee cellulari e poi abbiamo effettuato un immunoblot per Bcl-2. I risultati mostrano che la down-modulazione di PKC ϵ mediata da siRNA induce una riduzione dell'espressione della proteina Bcl-2 (**Figura 29B**), mentre l'over-espressione di PKC ϵ , ma non di PKC ϵ_m , aumenta i livelli di Bcl-2 (**Figura 29C**).

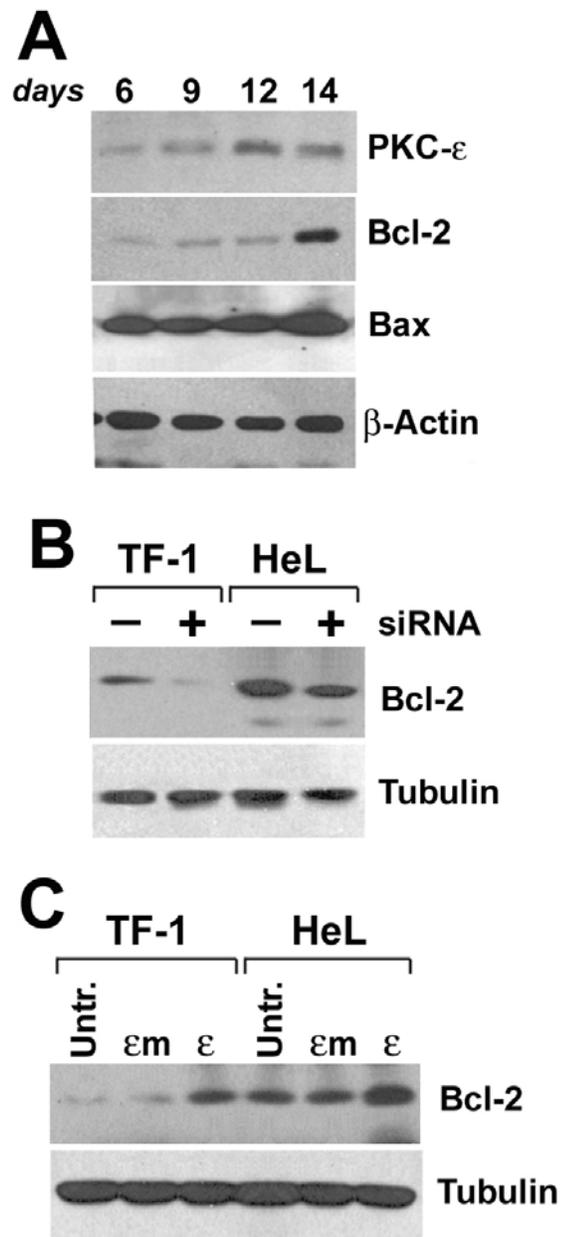


Figura 29. PKC ϵ modula i livelli di Bcl-2.

Pannello A: eritroblasti derivati da CD34 sono stati mantenuti in presenza di IL-3, SCF e EPO sino a 14 giorni ed i livelli di espressione di Bcl-2, PKC ϵ e Bax sono stati analizzati mediante western blot.

Pannello B: western blot di Bcl-2 nelle line cellulari TF-1 e HeL in presenza (+) o assenza (-) di siRNA specifici per PKC ϵ .

Pannello C: western blot di Bcl-2 nelle line cellulari TF-1 e HeL che over-esprimono PKC ϵ “wild type” (ϵ) o mutata (ϵ m).

I livelli di espressione di PKC ϵ modulano il differenziamento MK

La PKC ϵ non svolge un ruolo solo nel differenziamento eritroide, ma anche nella prime fasi della definizione della filiera megacariocitaria (MK). Abbiamo ipotizzato che i livelli di espressione di PKC ϵ possano essere modulati durante il differenziamento MK, con uno specifico ruolo nella trombopoiesi sia nelle sue fasi precoci che in quelle tardive.

Abbiamo dimostrato che, diversamente dal differenziamento eritroide, PKC ϵ è completamente down-modulata nel differenziamento MK in cellule CD34 trattate con TPO per almeno 6 giorni. L'espressione forzata di PKC ϵ durante la fase tardiva del differenziamento MK interferisce con la differenziazione fenotipica dei progenitori, probabilmente attraverso l'up-regolazione dei livelli Bcl-xL. TRAIL, che è un regolatore negativo dell'espansione eritroide, non svolge un'azione apoptogena su cellule CD34 trattate con TPO, ma sembra favorire il loro differenziamento. Comunque, i livelli di PKC ϵ interferiscono negativamente anche con gli effetti di TRAIL durante il differenziamento MK.

Date queste osservazioni, PKC ϵ può essere considerato un intermedio nella via di segnalazione differenziativa, la cui espressione deve essere finemente regolata, con una cinetica apparentemente opposta nelle filiere eritroide e megacariocitaria.

I livelli di PKC ϵ sono modulati durante il differenziamento MK

Sulla base di precedenti studi sull'attività della PKC ϵ durante le fasi precoci della megacariocitopoiesi (Goldfarb et al., *J Biol Chem* 2001), abbiamo per prima cosa analizzato la cinetica dell'espressione di PKC ϵ durante il differenziamento MK indotto da TPO in cellule CD34⁺ primarie umane. Abbiamo poi valutato i livelli di PKC ϵ mediante analisi in western blot di campioni di CD34 isolate da 5 donatori sani non correlati. Le cellule sono state coltivate sino a 14 giorni in terreno privo di siero e supplementato con IL-3 e SCF, in presenza o assenza (controllo) di TPO. Durante il periodo di coltura

cellulare, il TPO induce il differenziamento MK delle cellule CD34, evidenziato dall'espressione precoce e stabile della GPIIIa (CD61) e dalla successiva espressione della GPIb (CD42b), come antigeni di superficie (**Figura 30A**). In assenza di TPO, sia il CD61 che il CD42b non vengono espressi per tutto il periodo di analisi. Altri marcatori specifici per il differenziamento mieloide (Glicoforina A, CD14 e CD15) erano sempre negativi. L'analisi morfologica delle cellule in coltura ha dimostrato che le CD34⁺ trattate con TPO stavano differenziando lungo la filiera megacariocitica, diventando grandi e multinucleate (Zauli et al., *Blood* 1997) (**Figura 30B**).

Il TPO induce l'espressione di PKCε durante le fasi precoci del differenziamento (**Figura 30C**), concordemente a dati precedenti (Goldfarb et al., *J Biol Chem* 2001), che dimostravano un ruolo funzionale per la PKCε all'inizio della megacariocitopoiesi. Comunque, a partire dal giorno 6, i livelli di PKCε diminuiscono velocemente, nonostante la continua presenza del TPO nella coltura cellulare. In **Figura 30D** sono riportate le valutazioni densitometriche dei campioni testati. Da notare che la cinetica di espressione della PKCε indotta da TPO nelle cellule CD34 è opposta a quella descritta precedentemente nei precursori eritroidi (Mirandola et al., *Blood* 2006) (**Figura 31**).

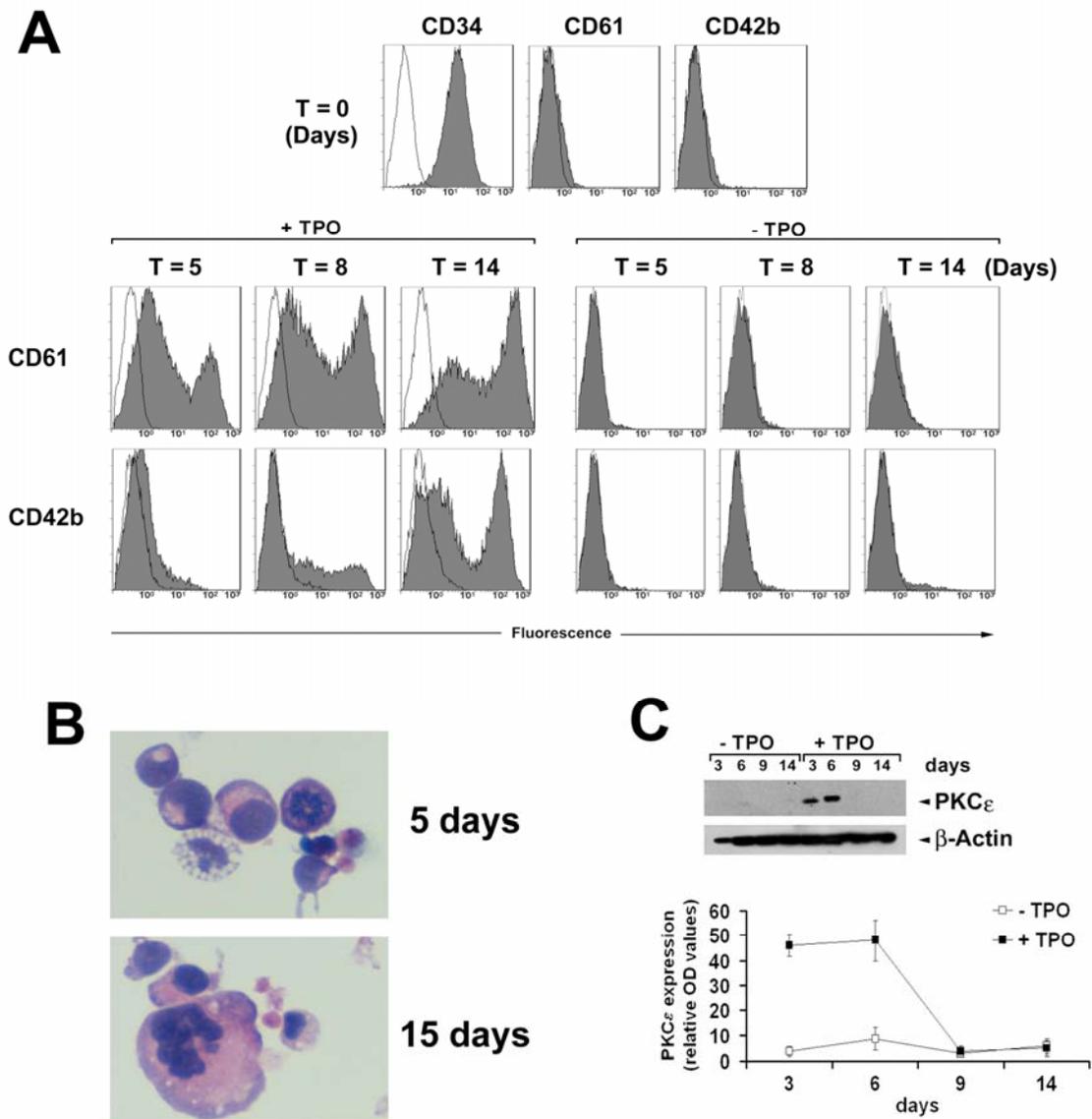


Figura 30. I livelli di PKC ϵ sono modulati durante il differenziamento MK.

Pannello A: differenziamento indotto da TPO di cellule CD34 umane. La popolazione di partenza (T=0) è CD34⁺ e non esprime antigeni MK. Ai tempi indicati, le cellule megacarioblastiche derivate da CD34 sono state incubate con specifici mAb per Glicoforina A, CD14, CD15, CD61 e CD42b, come descritto nei *Materiali e Metodi*. Gli istogrammi di fluorescenza specifica (grigio) sono stati sovrapposti ai controlli negativi (istogramma vuoto). Glicoforina A, CD14 e CD15 non sono espressi durante il periodo di coltura. In assenza di TPO, sia CD61 che CD42b non sono espressi.

Pannello B: la morfologia delle cellule in coltura mostra che le CD34⁺ trattate con TPO stavano differenziando lungo la filiera megacariocitica (colorazione eosina/ematosilina. Ingrandimento, 40 \times).

Pannello C: analisi in western blot dell'espressione della proteina PKC ϵ totale in cellule CD34 mantenute in terreno privo di siero con IL3 e SCF in presenza (+TPO) o assenza (-TPO) di trombopoietina. La β -Actina è stata valutata come controllo di concentrazione proteica.

Pannello D: livelli di espressione della proteina PKC ϵ durante il differenziamento MK di cellule CD34. Misure densitometriche di analisi in western blot da 5 donatori sani non correlati (media \pm DS).

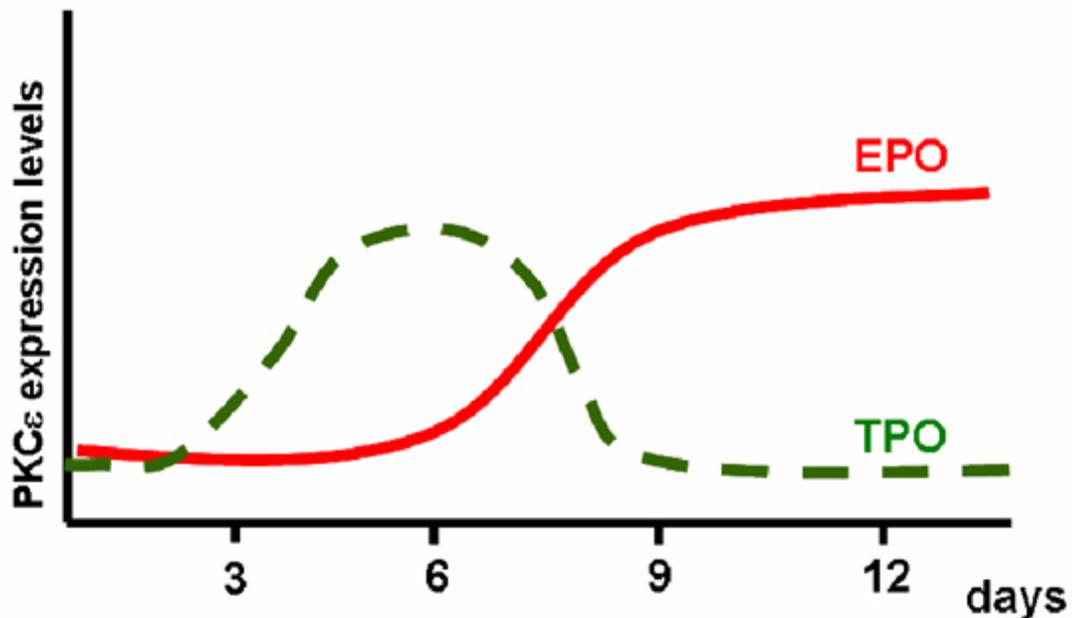


Figura 31. Cinetica di PKC ϵ indotta da TPO in cellule CD34.

Livelli di espressione di PKC ϵ durante i primi 14 giorni di differenziamento MK indotto da TPO (linea tratteggiata in verde), in confronto con il differenziamento eritroide indotto da EPO (linea continua in rosso).

TRAIL favorisce il differenziamento MK indotto da TPO

Dal momento che EPO aumenta la sensibilità dei progenitori eritroidi precoci a TRAIL, mentre PKC ϵ li protegge dall'apoptosi indotta da TRAIL (Mirandola et al., *Blood* 2006), abbiamo ipotizzato che TPO potrebbe avere simili effetti sui precursori MK. Per cui abbiamo verificato se i precursori MK erano esposti all'apoptosi a partire dal giorno 6, quando i livelli di PKC ϵ erano fisiologicamente down-modulati, analizzando l'espressione di superficie dei TRAIL-R. Le cellule CD34 differenziate con TPO mostrano una chiara espressione di TRAIL-R2 ed una più debole espressione di TRAIL-R1 e R4. Al contrario, TRAIL-R3 non è mai espresso durante i 20 giorni di coltura (**Figura 32A**). Nonostante l'espressione dei TRAIL-R, le cellule CD34 trattate con TPO erano resistenti all'effetto apoptogeno di TRAIL (**Figura 32B**), mentre le cellule CD34 trattate con EPO, coltivate in

parallelo ed utilizzate come controllo positivo per TRAIL, erano uccise con efficacia (**Figura 32C**).

Tuttavia TRAIL può anche agire come una citochina – piuttosto che come un ligando di morte – promuovendo in particolare il differenziamento mieloide. In accordo con i dati pubblicati da Melloni e collaboratori (*J Cell Physio.* 2005) abbiamo visto che l'aggiunta di 25 ng/ml di TRAIL alle cellule CD34 primarie trattate con TPO aumenta l'espressione di superficie sia dell'antigene di differenziamento MK precoce CD61 che di quello tardivo CD42b (**Figura 32D**).

I livelli di PKCε interferiscono con il differenziamento MK

Data la modulazione di PKCε durante il differenziamento MK, abbiamo incominciato a cercare un possibile ruolo della PKCε nei precursori MK. Abbiamo quindi over-espresso la PKCε in cellule CD34 primarie trattate con TPO al giorno 6, quando i livelli di PKCε sono fisiologicamente down-modulati, utilizzando come controllo negativo una using PKCε inattiva con la mutazione K522M (PKCε_m) (Mirandola et al., *Blood* 2004). L'over-espressione di PKCε, ma non di PKCε_m, ha indotto una significativa down-modulazione dell'espressione dei marcatori di superficie CD61 e CD42b, come valutato mediante citometria a flusso quantitativa (**Figura 33A**). quando i precursori MK sono stati trattati con TRAIL per favorire il loro differenziamento, l'over-espressione di PKCε ha annullato anche il suo effetto promotore sui precursori MK (**Figura 33B**).

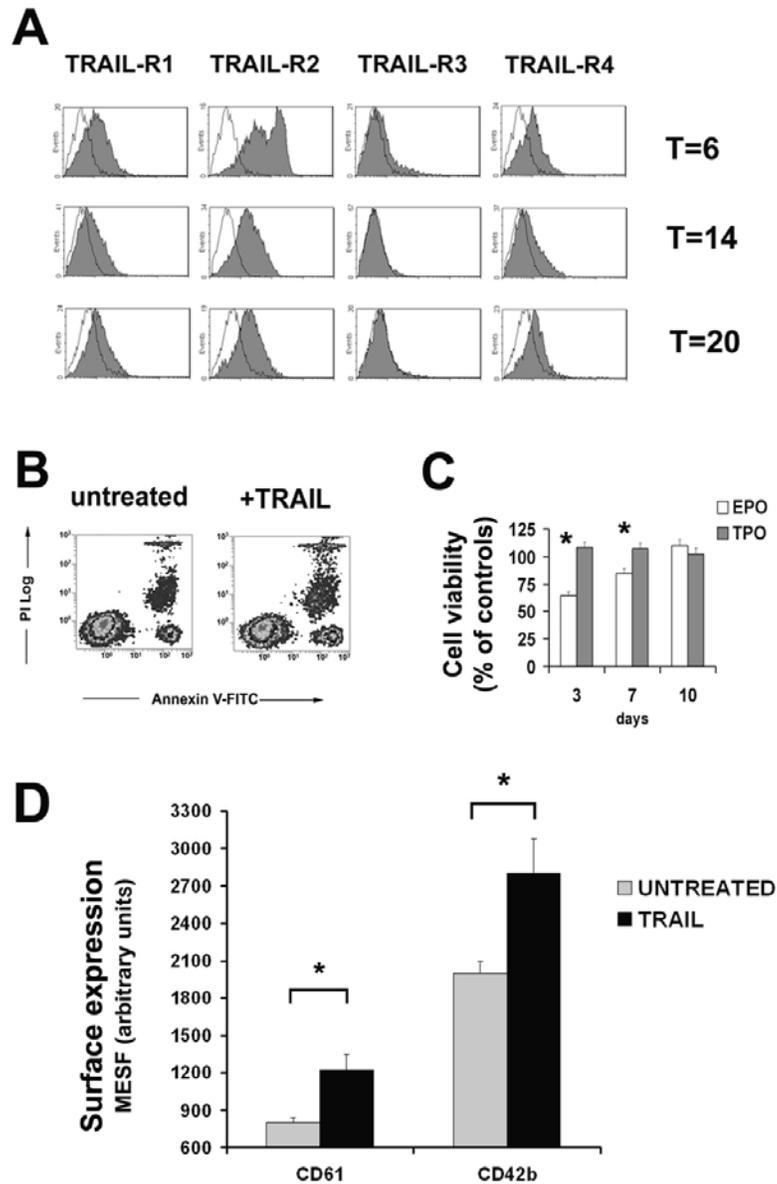


Figura 32. I megacariociti in differenziamento sono resistenti a TRAIL.

Pannello A: cellule CD34 purificate sono state differenziate per 20 giorni in terreno privo di siero con IL-3 e SCF in presenza di TPO. Ai tempi indicati (T = giorni), è stata valutata l'espressione dei TRAIL-Rs mediante l'incubazione con specifici mAb e l'immunofenotipo. Istogramma grigio: fluorescenza specifica; istogramma vuoto: controllo.

Pannello B: analisi citofluorimetrica di cellule CD34 (TPO, SCF e IL-3) trattate con 100 ng/ml di TRAIL per 24 ore: la vitalità cellulare residua è stata valutata mediante l'incubazione delle cellule apoptotiche con Annessina V-FITC e PI. Le cellule CD34 trattate con TPO sono resistenti all'apoptosi.

Pannello C: aliquote di cellule CD34 sono state differenziate con EPO, parallelamente a TPO, e utilizzate come controllo positivo per TRAIL. Differentemente dai megacarioblasti, gli eritroblasti sono stati uccisi in modo efficace da TRAIL. I controlli negativi sono stati coltivati in assenza di TRAIL. I dati ottenuti da 5 donatori sani non correlati sono stati espresso come media \pm D.S. (* $P < 0.05$).

Pannello D: effetti di TRAIL su cellule CD34 trattate con TPO. Le cellule CD34⁺ purificate sono state coltivate per 14 giorni in terreno privo di siero con IL-3, SCF e TPO, in presenza o assenza di 25 ng/ml di TRAIL. I dati ottenuti da 5 donatori sani non correlati sono stati espresso come media \pm D.S. (* $P < 0.05$). I dati sono indicati come valori assoluti (MESF). Gli istogrammi relativi al CD61 sono riportati ad una scala inferiore poichè le molecole di CD42b al giorno 14 sono in numero superiore rispetto a quelle del CD61.

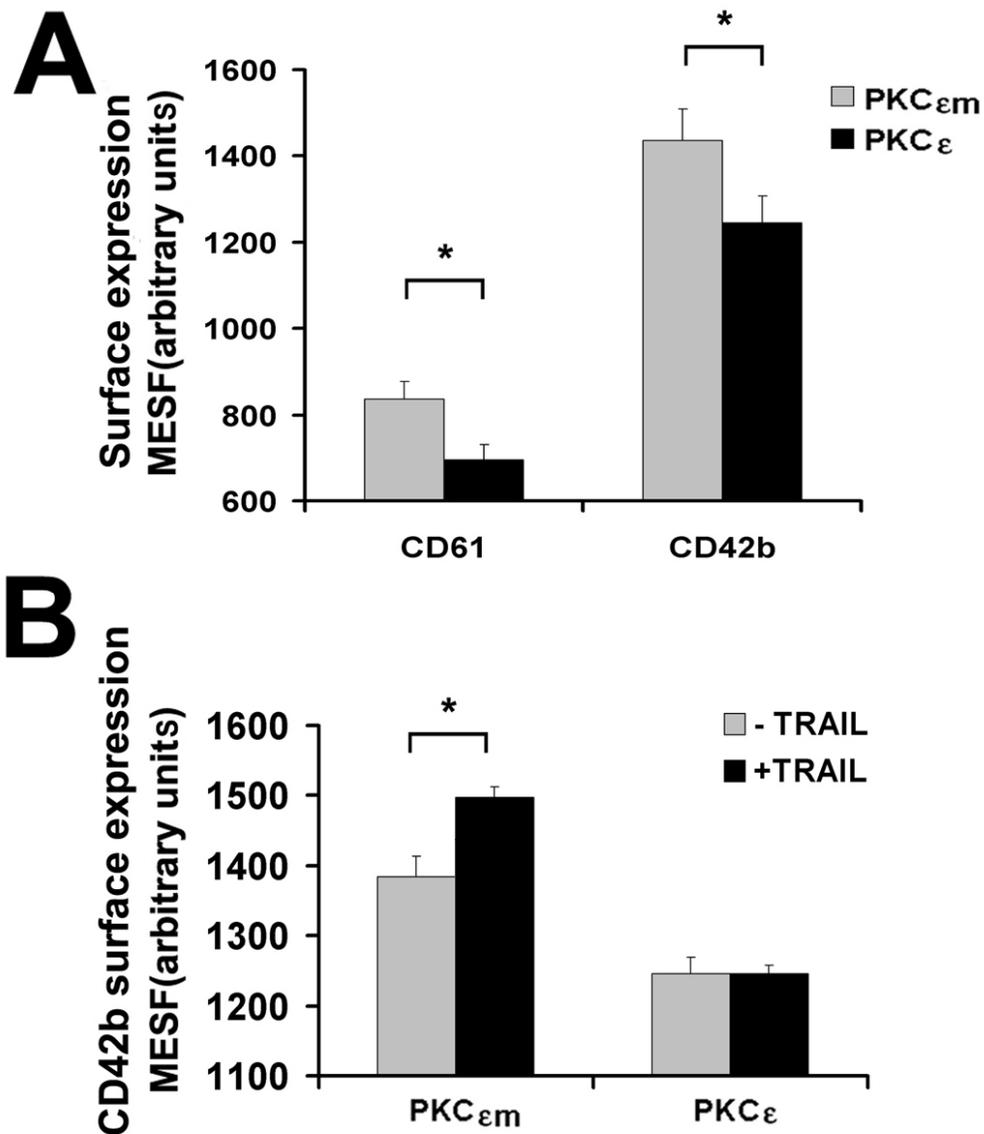


Figura 33. I livelli di PKC ϵ interferiscono con il differenziamento MK.

Pannello A: l'over-espressione di PKC ϵ riduce la densità dei marcatori di superficie MK in cellule CD34 trattate con TPO. Le colture di cellule CD34 da 3 donatori sani indipendenti sono state transfettate (al giorno 8 di coltura) con plasmidi contenenti PKC ϵ (PKC ϵ , istogramma nero) o PKC ϵ mutata (PKC ϵ m, istogramma grigio) e mantenute in coltura per ulteriori 5 giorni. I valori sono espressi come media \pm DS del numero assoluto degli antigeni di superficie espressi/cellula.

Pannello B: effetti di TRAIL sull'espressione del CD42b in megacarioblasti derivati da CD34 e transfettati con PKC ϵ (PKC ϵ) o PKC ϵ mutata (PKC ϵ m). Le cellule CD34 da 3 donatori sani sono state transfettate al giorno 8 e mantenute in coltura per ulteriori 5 giorni in presenza o assenza di 25 ng/ml di TRAIL. I valori sono espressi come media \pm DS del numero assoluto degli antigeni di superficie espressi/cellula.

PKCε modula Bcl-xL nei progenitori MK

E' noto che TPO induce l'espressione di Bcl-xL durante il precoce differenziamento MK (Sanz et al., *Exp Hematol* 2001; Kirito et al., *J Biol Chem* 2002; Zhang et al., *Haematologica* 2004), proteggendo le cellule dall'apoptosi. Inoltre, i livelli di Bcl-xL devono essere down-modulati durante le fasi tardive della trombopoiesi per una corretta maturazione MK e produzione di piastrine (Sanz et al., *Exp Hematol* 2001; Kaluzhny et al., *Blood*. 2002). Di conseguenza ci siamo chiesti se PKCε potesse avere un ruolo rilevante nella modulazione di Bcl-xL indotta da TPO. Per cui abbiamo analizzato mediante western blot i livelli di espressione di PKCε e Bcl-xL in cellule CD34 trattate con TPO. La **Figura 34A e B** mostra che in cellule CD34 trattate con TPO, Bcl-xL viene down-modulato dopo il giorno 6 di trattamento con una cinetica simile a quella di PKCε. Tuttavia, per verificare che i livelli di Bcl-xL fossero modulati da PKCε, abbiamo forzato l'espressione di PKCε o PKCεm in cellule CD34 trattate con TPO al giorno 8 di coltura e di conseguenza abbiamo analizzato l'espressione di Bcl-xL dopo successivi 5 giorni di coltura. La **Figura 34C** mostra che l'over-espressione di PKCε, ma non di PKCεm (controllo) aumenta i livelli di espressione di Bcl-xL in precursori MK primari. La **Figura 34D** riporta i valori densitometrici ottenuti da 2 donatori sani non correlati.

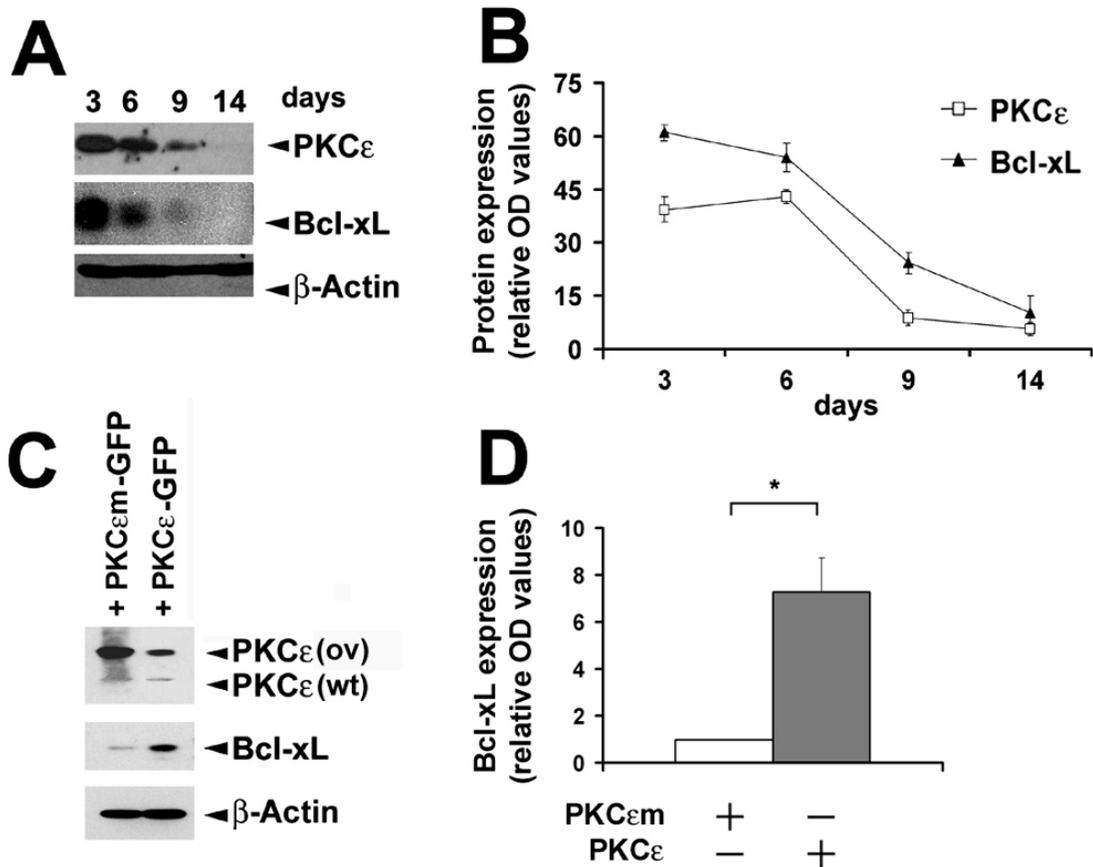


Figure 34. PKC ϵ modula Bcl-xL in precursori MK derivati da CD34.

Pannello A: megacarioblasti derivati da CD34 differenziati con TPO sino a 14 giorni. I livelli di espressione proteica di Bcl-xL e PKC ϵ totali sono stati valutati ai tempi indicati mediante western blot.

Pannello B: livelli di espressione delle proteine PKC ϵ e Bcl-xL durante il differenziamento megacariocitario di cellule CD34. Misure densitometriche dei western blot ottenuti da 5 donatori sani non correlati (media \pm DS).

Pannello C: analisi in western blot di PKC ϵ e Bcl-xL in cellule CD34 trattate con TPO. Le cellule sono state trasfettate al giorno 8 di coltura con i plasmidi contenenti PKC ϵ -GFP o PKC ϵ m-GFP e poi mantenute in coltura sino al giorno 13. I campioni sono stati immunoblottati con gli anticorpi anti-PKC ϵ e anti-Bcl-xL [PKC ϵ (ov) = PKC ϵ o PKC ϵ m over-espressa; PKC ϵ (wt) = PKC ϵ endogena]. I livelli di Bcl-xL sono up-regolati dalla over-espressione di PKC ϵ .

Pannello D: livelli dell'espressione proteica di Bcl-xL durante il differenziamento megacariocitario di cellule CD34 che over-esprimono PKC ϵ (PKC ϵ) o PKC ϵ mutata (PKC ϵ m). Misure densitometriche di western blot ottenuti da 2 donatori sani non correlati (media \pm DS).

DISCUSSIONE

Le cellule progenitrici eritroidi sono in gran parte quiescenti, e necessitano di EPO per iniziare il ciclo cellulare, mentre i progenitori eritroidi tardivi necessitano di EPO essenzialmente come un fattore di sopravvivenza che le renda capaci di raggiungere il differenziamento terminale. *In vivo*, la concentrazione fisiologica di EPO è sub-ottimale, comportando l'apoptosi di circa il 20% delle cellule eritroidi del midollo osseo (Shetty et al., *Blood* 2000). E' noto che il differenziamento eritroide può essere regolato negativamente dai ligandi dei recettori di morte presenti nelle nicchie midollari, come Fas e TRAIL.

Abbiamo dimostrato che, in progenitori eritroidi in via di differenziamento, i livelli di PKC ϵ sono regolati da EPO e controllano la resistenza agli effetti apoptogeni di TRAIL. PKC ϵ è importante nella via segnaletica mediata dai recettori per citochine e fattori di crescita. Ciò è stato ben dimostrato dalle osservazioni che la perdita di PKC ϵ risulta in una risposta estremamente attenuata dei macrofagi ad LPS e IFN γ in animali PKC $\epsilon^{-/-}$, così come in una interferenza nella via segnaletica dei recettori del PDGF (Castrillo et al., *J Exp Med* 2001; Saito et al., *J Biol Chem* 2002). E' stato anche dimostrato che PKC ϵ agisce come un intermedio tra i "pathways" di segnale di integrine e di IFN γ (Ivaska et al., *Nat Cell Biol* 2003). E' stato precedentemente dimostrato che PKC ϵ è una delle isoforme di PKC modulate durante il differenziamento delle cellule eritroidi sia nell'uomo che nel topo (Bassini et al., *Blood* 1999) e che TRAIL, come membro della famiglia del TNF, può regolare negativamente l'eritropoiesi (Zamai et al., *Blood* 2000). I dati riportati in questa

tesi dimostrano che EPO promuove nelle cellule CD34 umane una serie di eventi che, presentando una cinetica finemente regolata, determinano la sensibilità di queste cellule a TRAIL. Infatti, al giorno 0 le cellule CD34⁺ sono insensibili a TRAIL in quanto non esprimono i recettori di morte sulla loro superficie. PKC ϵ è virtualmente assente in questo precoce periodo di differenziamento. Dal giorno 3 in poi, i progenitori eritroidi in via di differenziamento esprimono sulla loro superficie i recettori di morte TRAIL-R1 e -R2, mentre i livelli di PKC ϵ non sono ancora rilevabili. Le cellule diventano sensibili a TRAIL, e l'over-espressione di PKC ϵ a questo livello abroga l'apoptosi indotta da TRAIL. Intorno al giorno 7/8, i livelli di PKC ϵ aumentano rapidamente, mentre l'espressione di superficie dei recettori di morte rimane stabile. L'induzione di PKC ϵ è EPO-dipendente, poichè le cellule CD34 di controllo mantenute in presenza di SCF e IL-3 non up-regolano la sintesi di PKC ϵ . L'aumento dei livelli di PKC ϵ conferisce alle cellule eritroidi la resistenza a TRAIL, nonostante l'espressione di superficie dei recettori di morte e la virtuale assenza dei recettori decoy. La resistenza all'apoptosi dipende dall'induzione di PKC ϵ , dal momento che sia il silenziamento dell'mRNA per PKC ϵ con conseguente down-modulazione della sintesi proteica, che l'inibizione farmacologica dell'attivazione di PKC ϵ sono in grado di ristabilire la sensibilità delle cellule all'azione di TRAIL. Molto recentemente, Gillespie ed i suoi collaboratori (*Mol Cancer Ther* 2005) hanno dimostrato che i livelli di PKC ϵ sono correlati con la sensibilità a TRAIL delle linee cellulari di melanoma, suggerendo che PKC ϵ potrebbe avere un ruolo generale nella precisa regolazione delle vie di segnalazione attivate dai recettori di morte.

I nostri dati mostrano che la molecola antiapoptotica Bcl-2 è un possibile mediatore della resistenza delle cellule eritroidi a TRAIL. Infatti, i livelli di Bcl-2 nei progenitori eritroidi sono up-regolati con una cinetica simile a quella di PKC ϵ indotta da EPO. L'osservazione, nel nostro modello, dei reciproci effetti della down-modulazione o dell'over-espressione di PKC ϵ sui livelli di Bcl-2 dimostra che la proteina Bcl-2 è modulata dai livelli di espressione di PKC ϵ . Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti da Gubina e i suoi collaboratori (*Blood* 1998), dove dimostrano che l'over-espressione di PKC ϵ nella linea cellulare TF-1 è in grado di indurre l'espressione di Bcl-2. Comunque, non possiamo escludere che altri intermedi antiapoptotici possano contrastare gli effetti di TRAIL. Per esempio, sebbene nei nostri esperimenti i livelli di Bax rimangano costanti, McJilton e collaboratori (*Oncogene* 2003) hanno dimostrato che nelle linee cellulari di tumore alla

prostata LNCaP, PKC ϵ può interagire con Bax impedendone la modificazione conformazionale necessaria per il sistema mitocondriale di segnalazione apoptotica.

I dati ottenuti ci fanno ipotizzare una progressione del differenziamento dei progenitori eritroidi durante la quale c'è una fase iniziale di resistenza a TRAIL – dovuta all'assenza dell'espressione degli specifici recettori sulla superficie cellulare – seguita da un periodo di sensibilità che termina verso il giorno 7, poiché si ha una up-regolazione di PKC ϵ , indotta da EPO, con a valle un effetto positivo su Bcl-2.

PKC ϵ risulta essere, quindi, una nuova proteina quantitativamente regolatrice sia dell'espansione cellulare dipendente da EPO che della sopravvivenza cellulare durante l'eritropoiesi, come è stato recentemente suggerito per Btk (Schmidt et al., *J Exp Med* 2004).

Sebbene le conoscenze sulle basi molecolari della megacariocitopoiesi siano aumentate notevolmente durante gli ultimi anni, numerosi aspetti di tale processo di differenziamento, come anche delle sue relazioni con l'eritropoiesi, sono ancora oscuri. Le cellule staminali devono prendere una serie di decisioni per lo sviluppo, come conseguenza di un'attivazione stocastica dei fattori di trascrizione, che guidano il loro destino verso la filiera mieloide o linfoide, e dal progenitore mieloide ai progenitori bipotenti eritro/megacariocitico o granulo/monocitico. Come risultato, le filiere eritroide e megacariocitaria, indirizzate rispettivamente dalle specifiche citochine EPO e TPO, presentano uno schema simile di fattori di trascrizione, di caratteristiche biologiche e, in seguito a particolari condizioni di stress, di precursori bi-potenti anche tardivi (Vannucchi et al., *Blood* 2000).

Siccome abbiamo dimostrato che i livelli di PKC ϵ sono finemente modulati da EPO al fine di proteggere i progenitori eritroidi tardivi dagli effetti apoptogeni di TRAIL, ci siamo chiesti quali fossero i livelli di PKC ϵ durante il differenziamento megacariocitario.

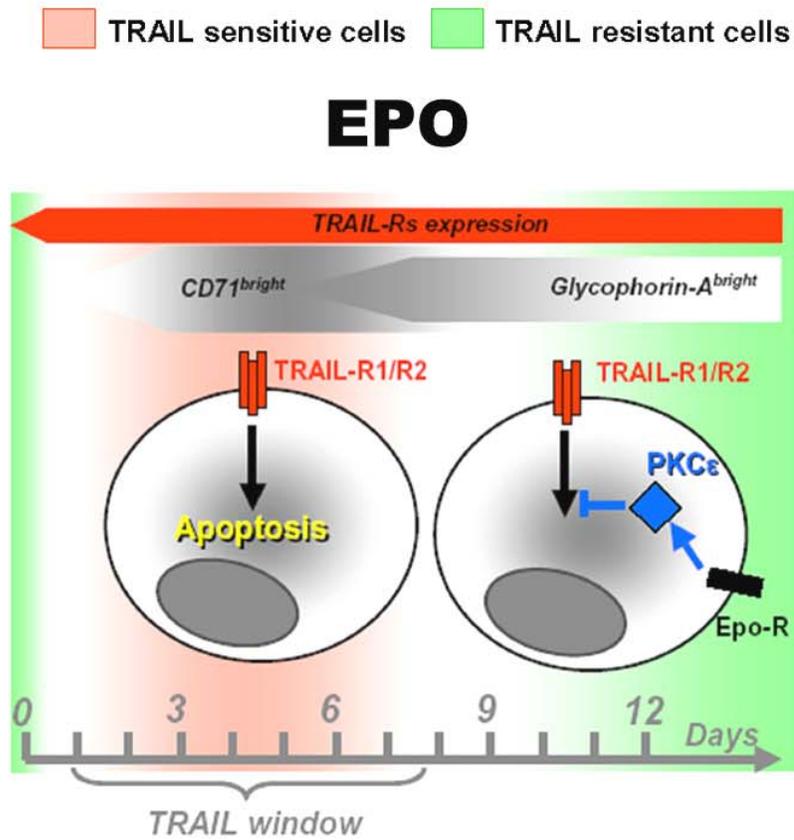
I dati ottenuti dimostrano che nei progenitori MK, i livelli di PKC ϵ sono regolati da TPO con una cinetica opposta a quella descritta nei precursori eritroidi, essendo down-modulata da TPO a partire dal giorno 6. La rilevanza fisiologica di questa osservazione è dimostrata dal fatto che la persistenza di elevati livelli di PKC ϵ interferisce con la fase

tardiva del differenziamento MK, probabilmente mediante la down-modulazione successiva di Bcl-xL.

PKC ϵ ha un ruolo importante nella segnalazione dei recettori per i fattori di crescita e le citochine, e, come già accennato, la perdita di PKC ϵ comporta risposte estremamente attenuate dei macrofagi a LPS e IFN γ in animali PKC $\epsilon^{-/-}$, come anche un'interferenza nella segnalazione del recettore per PDGF (Castrillo et al., *J Exp Med* 2001; Saito et al., *J Biol Chem* 2002). È stato dimostrato che PKC ϵ agisce come un ponte tra le vie di segnalazione delle integrine e di IFN γ (Ivaska et al., *Nat Cell Biol* 2003). Più dettagliatamente, un ruolo per PKC ϵ nel differenziamento MK è stato proposto da Goldfarb e collaboratori, che hanno dimostrato che l'attività di PKC ϵ è essenziale nelle prime fasi del differenziamento MK di varie linee cellulari, cooperando col fattore di trascrizione GATA-1 nell'attivazione dei promotori megacariocitari, tra i quali il promotore di α IIB (Goldfarb et al., *J Biol Chem* 2001). I nostri dati sono in accordo con quelli ottenuti da Goldfarb e collaboratori, poiché abbiamo trovato alti livelli di PKC ϵ in cellule CD34 nei primi 6 giorni di trattamento con TPO. Inoltre, abbiamo dimostrato che a partire dal giorno 6 è necessario che i precursori MK down-modulino PKC ϵ , poiché l'espressione forzata di PKC ϵ dopo il giorno 6, interferisce con il successivo differenziamento dei precursori MK, attraverso l'up-regolazione di Bcl-xL. Infatti, è noto che i livelli di Bcl-xL devono essere down-modulati durante le fasi tardive della trombopoiesi. Abbiamo dimostrato che PKC ϵ è a monte di Bcl-xL, dal momento che entrambe sono modulate con una cinetica simile durante il differenziamento MK e che l'over-espressione di PKC ϵ induce Bcl-xL. Non possiamo escludere, anche in questo caso, che PKC ϵ possa modulare altri intermedi, oltre a Bcl-xL, in grado di interagire con la completa maturazione dei precursori MK. Comunque, livelli elevati di PKC ϵ interferiscono con il differenziamento MK promosso da TRAIL, che agisce come una citochina nella trombopoiesi umana. L'espressione forzata di PKC ϵ in cellule CD34 trattate con TPO, infatti, è sufficiente per abrogare gli effetti differenziativi di TRAIL nei precursori MK.

CONCLUSIONI

Nel complesso, i nostri dati dimostrano che nei progenitori ematopoietici CD34 la TPO induce rapidamente alti livelli di PKC ϵ , che sono poi down-modulati a partire dal giorno 6, verosimilmente per diminuire a valle i livelli di Bcl-xL che altrimenti interferirebbero con la fasi tardive del differenziamento MK. Quando compariamo le filiere di differenziamento eritroide e megacariocitaria, emerge che PKC ϵ è accuratamente modulata, e i suoi livelli di espressione sono sottoposti ad un preciso – ed opposto – controllo della cinetica. L’iniziale *periodo con bassa PKC ϵ* espone i precursori eritroidi precoci all’apoptosi indotta dai ligandi di morte (finestra di sensibilità a TRAIL, come indicato nella **Figura 35**: “TRAIL window”) per una regolazione negativa dell’espansione delle cellule della serie rossa. La successiva up-regolazione di PKC ϵ in seguito protegge i progenitori eritroidi tardivi dall’apoptosi indotta dai ligandi di morte extra-cellulari come TRAIL. Al contrario, il precoce *periodo con alta PKC ϵ* , che può contribuire a ridirigere il completo programma trascrizionale verso la megacariocitopoiesi, deve essere seguito da un finale *periodo con bassa PKC ϵ* che – diminuendo a valle l’espressione di Bcl-xL – porta alla corretta conclusione del processo trombopoietico (**Figura 35**).



TPO

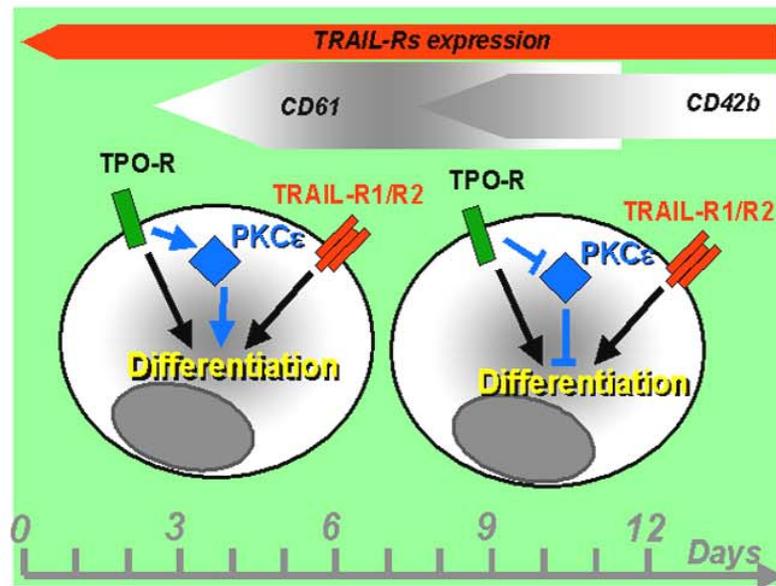


Figura 35. Schema del ruolo di PKCε nel differenziamento ematopoietico.

ABBREVIAZIONI

Per semplicità sono stati omessi numeri e caratteri che distinguono una particolare isoforma, mantenuti comunque nel testo. Sono state elencate solo le abbreviazioni più comuni, mentre le altre sono state spiegate nel testo.

aa: amino acid – amminoacido

Apaf: Apoptotic proteases activating factor – fattore attivante le proteasi apoptotiche

Apo2L: Apo2 Ligand – ligando Apo2

Bcl: B cell lymphoma – linfoma a cellule B

BH: Bcl-2 Homology – omologo di Bcl-2

CRD: Cysteine-Rich Domain – dominio ricco di residui di cisteina

Cy: Cyanin – cianina

DAG: DiAcylGlycerol – diacilglicerolo

DIABLO: Direct IAP Binding protein with LOW pH – proteina che lega le Iap a basso pH

DISC: Death-Inducing Signalling Complex – complesso di segnalazione che induce morte

DR: Death Receptor – recettori di morte

EPO: ErythroPOietin – eritropoietina

ERK: Extracellular Response-stimulated Kinase – chinasi stimolata da risposta extracellulare

FADD: Fas-Associated Death Domain – dominio di morte associate a Fas

FasL: Fas Ligand – ligando Fas

FBS: Fetal Bovine Serum – siero fetale bovino

FITC: Fluorescein isothiocyanate – fluorescina isotiocianato

FLIP: FLice-Inhibitory Protein – proteina inibitrice di Flice

FOXO: Forkhead member of the O class – membro a due teste della classe O

GATA: GATA binding protein – proteina che lega la sequenza GATA

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor – fattore stimolante le colonie di granulociti

GFP: Green Fluorescent Protein – proteina fluorescente in verde

GRB: Growth factor Receptor-Bound protein – proteina legata al recettore dei fattori di crescita

GSK: Glycogen Synthase Kinase – chinasi della sintasi del glicogeno

HGF: Hematopoietic Growth Factor – fattore di crescita ematopoietico

HIF: hypoxia-inducible factor – fattore ipossia-inducibile

HSC: Hematopoietic Stem Cell – cellule staminali ematopoietiche

IAP: Inhibiting-Apoptosis Protein – proteina inibitrice dell'apoptosi

IFN: InterFeroN – interferone

IL: InterLeukin – interleuchina

JAK: JAnus Kinasi – chinasi Janus

JNK: Jun N-terminal kinase – chinasi della porzione N-terminale di Jun

LPS: LipoPolySaccharide – lipopolisaccaride

LT: LymphoToxin – linfotossina

mAb: monoclonal Antibody – anticorpo monoclonale

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase – proteina chinasi attivate da mitogeno

MESF: Molecules of Equivalent Soluble Fluorescein – molecole dell'equivalente fluorescenza solubile

MK: MegaKaryocytic – megacariocitico

Omi/HtrA2: High-temperature-requirement protein – proteina che richiede alta temperatura

PBL: Peripheral Blood Lymphocyte – linfociti di sangue periferico

PCR: Polimerase Chain Reaction – reazione a catena della polimerasi

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor – fattore di crescita derivato dalle piastrine

P-FOX: Phosphatase FORkhead – fosfatasi a due teste

P-GSK: Phosphatase Glycogen Synthase Kinase – fosfatasi della chinasi della sintasi del glicogeno

PI: Propidium Iodide – ioduro di propidio

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase – fosfatidilinositolo-3-chinasi

PKC: Protein Kinase C – proteina chinasi C

PMA: Phorbol Myristate Acetate – estere del forbolo

RPE: R-PhycoErythrin – R-ficoeritrina

RT-PCR: Reverse Transcription PCR – trascrizione inversa della PCR

SCF: Stem Cell Factor – fattore delle cellule staminali

SH: Src Homolog – omologo di Src

SHC: Src Homology domain Containing – contenente il dominio di omologia con Src

SHP: Shc Homology domain containing Phosphatase – fosfatasi contenente il dominio di omologia con Shc

Smac: Second mitochondrial derived activator of caspase – attivatore delle caspasi derivato dai mitocondri

SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling – soppressore della segnalazione citochinica

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription – trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione

TGF: Tumor Growth Factor – fattore di crescita tumorale

TNF: Tumor Necrosis Factor – fattore di necrosi tumorale

TNFRSF: Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily – superfamiglia dei recettori per TNF

TPO: Thrombopoietin – trombopoietina

TRADD: TnfRsf1A-Associated via Death Domain – associate al membro 1A della TNFRSF attraverso il dominio di morte

TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand – ligando correlato a TNF che induce apoptosi

TRAIL-R: TRAIL-Receptor – recettore di TRAIL

VEGF: Vascular Endothelial cell Growth Factor – fattore di crescita dell'endotelio vascolare

XIAP: X-linked mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein – inibitore delle proteine apoptotiche legato al cromosoma x dei mammiferi

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK et al. *Immunologia cellulare e molecolare* 2001. Ed. Piccin, Padova.
- Alam A et al. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 1999; 190: 1879–90.
- Alexander WS & Dunn AR. Structure and transcription of the genomic locus encoding murine c-Mpl, a receptor for thrombopoietin. *Oncogene* 1995; 10: 795–803.
- Anderlini P et al. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood* 1996; 88: 2819–2825.
- Antonsson B et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 11615–11623.
- Arai F et al. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche, *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 75–79.
- Ashkenazi A & Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305–1308.
- Bakhshi A et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899–906.
- Baliga BC & Kumar S. Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol* 2002; 20: 63–74.
- Ballen KK et al. Expression and activation of protein kinase C isoforms in a human megakaryocytic cell line. *Exp Hematol* 1996; 24: 1501–1508.
- Ballmaier M et al. c-mpl Mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001; 97: 139–146.

- Balsinde J & Balboa MA. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells *Cell. Signal* 2005; 17: 1052–1062.
- Basanez G et al. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* 2001; 276: 31083–31091.
- Bassini A et al. Lineage-restricted expression of protein kinase C isoforms in hematopoiesis. *Blood* 1999; 93: 1178–1188.
- Basu A & Haldar S. Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2003; 538: 41–47.
- Bodmer JL et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 241–243.
- Bogdanov et al. Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing BCL-2. *Neurosci Lett* 1999; 262: 33–36.
- Bouscary D et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 2003; 101: 3436–3443.
- Bouscary D et al. Role of Gab proteins in phosphatidylinositol 3-kinase activation by thrombopoietin (Tpo). *Oncogene* 2001; 20: 2197–2204.
- Brines ML et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10526–10531.
- Broudy VC et al. Human platelets display high affinity receptors for thrombopoietin. *Blood* 1997; 89: 1896–1904.
- Bruce-Keller AJ et al. Bcl-2 protects isolated plasma and mitochondrial membranes against lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 1998; 70: 31–39.
- Campioni D et al. Evidence for a role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the anemia of myelodysplastic syndromes. *Am J Pathol* 2005; 166: 557–563.
- Cantor AB & Orkin SH. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 513–519.
- Castagna M et al. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters *J Biol Chem* 1982; 257: 7847–7851.
- Castrillo A et al. Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1231–1242.
- Chen J et al. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ Res* 2004; 94: 370–376.
- Coers J et al. A truncated isoform of c-Mpl with an essential C-terminal peptide targets the full-length receptor for degradation. *J Biol Chem* 2004; 279: 36397–36404.

- Conus S et al. Failure of Bcl-2 family members to interact with Apaf-1 in normal and apoptotic cells. *Cell Death Differ* 2000; 7: 947–954.
- Corbalán-García & Gómez-Fernández. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 633–654.
- Corbalan-Garcia S et al. Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC epsilon. *Biochemistry* 2003; 42: 11661–11668.
- Cosman D. The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* 1993; 5: 95–106.
- D’Andrea AD et al. The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth-regulatory domains. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1980–1987.
- Danial NN & Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205–219.
- Datta SR et al. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 2000; 6: 41–51.
- de Botton S et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002; 100: 1310–1317.
- de la Chapelle A. et al., Familial erythrocytosis genetically linked to erythropoietin receptor gene. *Lancet* 1993; 341:82–84.
- de Sauvage FJ et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996; 183: 651–656.
- Degli-Esposti M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 535–542.
- Del C et al. Dynamic regulation of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter surface expression by PKC- ϵ in Cl(-) secretory epithelia. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2005; 289: 1332–1342.
- del Mar Martinez-Senac M et al. Study of the secondary structure of the C-terminal domain of the antiapoptotic protein bcl-2 and its interaction with model membranes. *Biochemistry* 2000; 39: 7744–7752.
- Deng Y et al. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 2002; 16: 33–45.
- Denisov Ayet al. Structural Model of the BCL-w-BID Peptide Complex and Its Interactions with Phospholipid Micelles. *Biochemistry* 2006; 45: 2250–2256.
- Denning MF. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1141–1146.
- Digicaylioglu M et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3717–3720.

- Dijkers PF et al. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9138–9148.
- Drachman JD et al. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood* 1997; 89: 483–492.
- Drachman JG et al.. Mpl signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem* 1999; 274: 13480–13484.
- Dusanter-Fourt I et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 10670–10675.
- Endo TA et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997; 387: 921–924.
- Fadeel B et al. Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1999; 13: 719–28.
- Farhadi A et al. The role of protein kinase C isoforms in modulating injury and repair of the intestinal barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1–7.
- Fox N et al. Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest* 2002; 110: 389–394.
- Gazitt Yet al. Apoptosis-induced by TRAIL AND TNF-alpha in human multiple myeloma cells is not blocked by BCL-2. *Cytokine* 1999; 11: 1010–1019.
- Geddis A et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J Biol Chem* 2001; 276: 34473–34479.
- Ghosh S et al. The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *J Biol Chem* 1994; 269: 10000–10007.
- Gillespie S et al. Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 668–676.
- Goekjian PG & Jirousek MR. Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 2117–2140.
- Goldfarb AN et al. Stromal inhibition of megakaryocytic differentiation correlates with blockade of signaling by protein kinase C-epsilon and ERK/MAPK. *J Biol Chem* 2001; 276: 29526–29530.
- Gomez-Fernandez J et al. Diacylglycerols as activators of protein kinase C. *Mol Membr Biol* 2004; 21: 339–349.
- Griesshammer M et al. Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *J Intern Med* 1999; 245: 295–300.

- Gubina E et al. Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and induces bcl-2 expression. *Blood* 1998; 91: 823–829.
- Han J et al. Differential involvement of Bax and Bak in TRAIL-mediated apoptosis of leukemic T cells. *Leukemia* 2004; 18: 1671–1680.
- Harper N et al. Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 44338–44347.
- He H et al. Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol* 1997; 138: 1219–1228.
- He L et al. Bcl-xL overexpression blocks bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1022–1027.
- Henry MK et al. Cytokine-induced phosphoinositide 3-kinase activity promotes Cdk2 activation in factor-dependent hematopoietic cells. *Exp Cell Res* 2004; 299: 257–266.
- Hinds MG et al. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J* 2003; 22: 1497–1507.
- Hirano Y et al. Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/P62 and MEK5. *J Biol Chem* 2004; 279: 31883–31890.
- Hockenbery D et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334–336.
- Huang DC & Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000; 103: 839–842.
- Huang LJ et al. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001; 8: 1327–1338.
- Hurley JH et al. Blumberg and Y. Nishizuka, Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* 1997; 6: 477–480.
- Huse M & Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 2002; 109: 275–282.
- Ihle JN & Kerr IM. JAKs and STATs in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995; 11: 69–74.
- Ito T et al. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* 1997; 272: 11671–11673.
- Ivaska J et al. PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J* 2002; 21: 3608–3619.
- Ivaska J et al. PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 363–369.

- Jiang N et al. The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta-receptor chimera. *J Biol Chem* 1996; 271: 16472–16476.
- Jiang Y et al. KiSS1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 369–376.
- Jimenez JL et al. Functional recycling of C2 domains throughout evolution: a comparative study of synaptotagmin, protein kinase C and phospholipase C by sequence, structural and modelling approaches. *J Mol Biol* 2003; 333: 621–639.
- Jo M et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6: 564–567.
- Juul SE et al. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 1998; 52: 235–249.
- Kaluzhny Y et al. BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood* 2002; 100: 1670–1678.
- Kaser A et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720–2725.
- Kaushansky K. Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 423–430.
- Kaushansky K. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: *Williams hematology* 2005. 7° edizione.
- Kaushansky K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *N Engl J Med* 2006; 354: 2034–2045.
- Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005; 105: 4187–4190.
- Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3339–3347.
- Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1044: 139–141.
- Kaushansky K. Thrombopoietin. Drug Therapy Series. *N Engl J Med* 1998; 339: 746–754.
- Kennedy N et al. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 1999; 190: 1891–1895.
- Keogh SA et al. Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2000; 471: 93–98.
- Kimberley FC & Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 2004; 14: 359–72.

- Kirito K et al. Thrombopoietin (TPO) induces the nuclear translocation of HoxA9 in hematopoietic stem cells (HSC): a potential explanation for the favorable effects of TPO on HSCs. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 6751–6762.
- Kirito K et al. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1 α . *Blood* 2005; 105: 4258–4263.
- Kirito K et al. Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 8329–8337.
- Kirito K et al. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 102: 3172–3178.
- Kirsch DG et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 1999; 274: 21155–21161.
- Kitajima Y et al. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell–cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999; 4: 137–144.
- Klingmuller U et al. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995; 80: 729–738.
- Klingmuller U. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells—signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 1997; 249: 637–647.
- Kojima H et al. Role of phosphatidylinositol-3 kinase and its association with Gab1 in thrombopoietin-mediated up-regulation of platelet function. *Exp Hematol* 2001; 29: 616–622.
- Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991; 77: 419–434.
- Kretz A et al. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29: 569–579.
- Kubota Y et al. Src transduces erythropoietin-induced differentiation signals through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J* 2001; 20: 5666–5677.
- Kutuk O & Basaga H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1661–1675.
- LeBlanc HN & Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10: 66–75.
- Li H et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491–501.
- Li J et al. Cloning and functional characterization of a novel c-mpl variant expressed in human CD34 cells and platelets. *Cytokine* 2000; 12: 835–844.

- Lindauer K et al. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* 2001; 14: 27–37.
- Linnekin D et al. Association of the erythropoietin receptor with protein tyrosine kinase activity, *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6237–6241.
- Livnah O et al. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 1999; 283: 987–990.
- Lopez-Andreo M et al. The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase Cepsilon to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 4885–4895.
- Lopez-Garcia F et al. Diacylglycerol, phosphatidylserine and Ca²⁺: a phase behavior study. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1190: 264–272.
- Luo X et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481–490.
- Marine JC et al. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 1999; 98: 609–616.
- Martelli AM et al. Nuclear protein kinase C isoforms and apoptosis, *Eur J Histochem* 2004; 48: 89–94.
- McCarty JM et al. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* 1995; 86: 3668–3675.
- McDonnell et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57: 79–88.
- McJilton MA et al. Protein kinase Cepsilon interacts with Bax and promotes survival of human prostate cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 7958–7968.
- Medkova M & Cho W. Differential membrane-binding and activation mechanisms of protein kinase C-alpha and -epsilon. *Biochemistry* 1998; 37: 4892–4900.
- Melloni E et al. Functional expression of TRAIL and TRAIL-R2 during human megakaryocytic development. *J Cell Physiol* 2005; 204: 975–982.
- Mellor H & Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 1998; 332: 281–292.
- Memon SA et al. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J Immunol* 1995; 155: 4644–4652
- Metcalf D et al. Aberrant hematopoiesis in mice with inactivation of the gene encoding SOCS-1. *Leukemia* 1999; 13: 926–934.

- Millot GA et al. MplK, a natural variant of the thrombopoietin receptor with a truncated cytoplasmic domain, binds thrombopoietin but does not interfere with thrombopoietin-mediated cell growth. *Exp Hematol* 2002; 30: 166–175.
- Mirandola P et al. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 2004; 104: 2418–2424.
- Mirandola P et al. PKCepsilon controls protection against TRAIL in erythroid progenitors. *Blood* 2006; 107: 508–513.
- Miura O et al. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4895–4902.
- Miura Y et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 1994 ;269: 29962–29969.
- Miyakawa Y et al. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 2494–2502.
- Moliterno AR et al. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998; 338: 572–580.
- Mora-Garcia P & Sakamoto KM. Granulocyte colony-stimulating factor induces Egr-1 up-regulation through interaction of serum response element-binding proteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 22418–22426.
- Moscat J et al. PKCz at the crossroad of NF-KB and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell Death Differ* 2006; 13: 702–711.
- Motoyama N et al. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med* 1999; 189: 1691–1698.
- Muchmore SW et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; 381: 335–341.
- Munugalavada & Kapur. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Critical Rev Oncol Hematol* 2005; 54: 63–75.
- Narumiya S et al. Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 1997; 410: 68–72.
- Nechushtan A et al. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999; 18: 2330–2341
- Ochoa W et al. Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca(2+)-independent C2 domains. *J Mol Biol* 2001; 311: 837–849.
- Oda E et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053–1058

- Oh KJ et al. Conformational changes in BID, a pro-apoptotic BCL-2 family member, upon membrane binding. A site-directed spin labeling study. *J Biol Chem* 2005; 280: 753–767.
- Ohno S & Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem (Tokyo)* 2002; 132: 509–511.
- Oka M & Kikkawa U. Protein kinase C in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 287–300.
- Oshevski S et al. Differential expression of protein kinase C isoform transcripts in human hematopoietic progenitors undergoing differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 603–609.
- Pappa H et al. Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure* 1998; 6: 885–894.
- Pastore YD et al. Mutations in the VHL gene in sporadic apparently congenital polycythemia. *Blood* 2003; 101: 1591–1595.
- Pegoraro L et al. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7166–7170.
- Petros AM et al. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 83–94.
- Pircher TJ et al. Integrative signaling by minimal erythropoietin receptor forms and c-Kit. *J Biol Chem* 2001; 276: 8995–9002.
- Pitti RM et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996; 271: 12687–12690.
- Ponting C et al. OPR, PC and AID: all in the PB1 family, *Trends Biochem Sci* 2002; 278: 10.
- Putchu GV et al. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 2003; 38: 899–914.
- Qian S et al. Primary role of the liver in thrombopoietin production shown by tissue-specific knockout. *Blood* 1998; 92: 2189–2191.
- Quelle FW & Wojchowski DM. Proliferative action of erythropoietin is associated with rapid protein tyrosine phosphorylation in responsive B6SUt.EP cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 609–614.
- Raff MC et al. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 2002; 296: 868–871.
- Ratcliffe PJ et al. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* 1998; 201: 1153–1162.
- Rebecchi MJ & Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 2000; 80: 1291–1335.

- Rojnuckarin P et al. The roles of PI3K and PKC ζ for thrombopoietin-induced MAP kinase activation in primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 41014–41022.
- Rojnuckarin P et al. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen activated protein kinase pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood* 1999; 94: 1273–1282.
- Ruffolo SC & Shore GC. BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem* 2003; 278: 25039–25045.
- Ruiz-Vela A et al. Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases. *EMBO Rep* 2005; 6: 379–385.
- Saharinen P et al. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 1448–1459.
- Saito Y et al. Protein kinase C-alpha and protein kinase C-epsilon are required for Grb2-associated binder-1 tyrosine phosphorylation in response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 2002; 277: 23216–23222.
- Sanz C et al. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol* 2001; 29: 728–735.
- Sarna MK et al. Differential regulation of SOCS genes in normal and transformed erythroid cells. *Oncogene* 2003; 22: 3221–3230.
- Sasaki A et al. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000; 275: 29338–29347.
- Sattler M et al. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997; 275: 983–986.
- Schendel SL et al. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5113–5118.
- Schmidt M et al. Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood* 2002; 100: 2737–2743.
- Schmidt U et al. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med* 2004; 199: 785–795.
- Schwartz A et al. Standardizing flow cytometry —Construction of a standardized fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators. *Cytometry* 1996; 26: 22.
- Secchiero P et al. TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* 2004; 103: 517–22.
- Secchiero P et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces monocytic maturation of leukemic and normal myeloid precursors through a caspase-dependent pathway. *Blood* 2002; 100: 2421–2429.

- Sheridan JP et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997; 277: 818–821.
- Shetty V et al. Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood* 2000; 96: 1388–1392.
- Shinohara H et al. A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 1162–1167.
- Shizuru JA et al. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 2005; 56: 509–538.
- Shultz LD et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 1993; 73: 1445–1454.
- Sinicrope FA et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8284–8292.
- Sitnicka E et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1996; 87: 4998–5005.
- Slater SJ et al. The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J Biol Chem* 1994; 269: 4866–4871.
- Socolovsky M et al. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999; 98: 181–191.
- Soderstrom TS et al. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *J Immunol* 2002; 169: 2851–2860.
- Solar GP et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* 1998; 92: 4–10.
- Sprick MR & Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 125–132.
- Starr R et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387: 917–921.
- Strasser A et al. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217–245.
- Sungaran R et al. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1997; 89: 101–107.
- Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005; 105: 2631–2639.

- Uddin S et al. Activation of the Akt/FKHRL1 pathway mediates the antiapoptotic effects of erythropoietin in primary human erythroid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 16–19.
- Valverde AM et al. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8572–8576.
- van Willigen G et al. Thrombopoietin increases platelet sensitivity to alpha-thrombin via activation of the ERK2-cPLA2 pathway. *Thromb Haemost* 2000; 83: 610–616.
- Vannucchi AM et al. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood* 2000; 95: 2559–2568.
- Vicca S et al. Apoptotic pathways involved in U937 cells exposed to LDL oxidized by hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2003; 35 :603–615.
- Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1339–1350
- Wang G et al. Direct binding to ceramide activates protein kinase czeta before the formation of a pro-apoptotic complex with PAR-4 in differentiating stem cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 26415–26424.
- Wang S & El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003; 22: 8628–8633.
- Wendling F et al. MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* 1986; 149: 242–246.
- Wiley SR et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673–682.
- Willis SN et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005; 19: 1294–1305.
- Witthuhn BA et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993; 74: 227–236.
- Wojchowski DM et al. Signal transduction in the erythropoietin receptor system, *Exp Cell Res* 1999; 253: 143–156.
- Wolber EM & Jelkmann W. Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 499–506.
- Wu H et al. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83: 59–67.
- Yamamoto K et al. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 8469–8478.

- Yanagida M et al. The role of transforming growth factor-beta in PEG-rHuMGDF-induced reversible myelofibrosis in rats. *Br J Haematol* 1997; 99: 739–745.
- Yang C et al. The physiological response of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to thrombocytopenia in the rat. *Br J Haematol* 1999; 105: 478-485.
- Yang J et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129–1132.
- Yi T et al. Hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin (Epo) receptor after Epo-induced receptor tyrosine phosphorylation: identification of potential binding sites. *Blood* 1995; 85: 87–95.
- Yoon SY et al. Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: immunoperoxidase staining patterns and clinical correlates. *Eur J Haematol* 2000; 65: 170–174.
- Yu J et al. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1931–1936.
- Zamai L et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood* 2000; 95: 3716–3724.
- Zauli G et al. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 1997; 90: 2234–2243.
- Zauli G et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sequentially upregulates nitric oxide and prostanoid production in primary human endothelial cells. *Circ Res* 2003; 92: 732–740.
- Zha J et al. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 2000; 290: 1761–1765.
- Zhang L et al. Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34+ bone marrow cells in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004; 89: 1199–1206.

ALLEGATI

Sono stati riportati i seguenti allegati:

- elenco delle Pubblicazioni scientifiche prodotte durante il periodo di svolgimento del Dottorato, triennio 2003-2006.
- testo dell'articolo più attinente all'argomento trattato in questa tesi pubblicato sulla rivista scientifica internazionale *Blood*.
- testo dell'Editoriale che la rivista *Blood* ha dedicato all'articolo allegato in esteso.

1. Vitale M, Caruso A, De Francesco MA, Rodella L, Bozzo L, Garrafa E, Grassi M, **Gobbi G**, Cacchioli A, Fiorentini S. HIV-1 matrix protein p17 enhances the proliferative activity of natural killer cells and increases their ability to secrete proinflammatory cytokines. *Br J Haematol* 2003 Jan;120(2):337-343.
2. **Gobbi G**, Mirandola P, Tazzari PL, Ricci F, Caimi L, Cacchioli A, Papa S, Conte R, Vitale M. Flow cytometry detection of serotonin content and release in resting and activated platelets. *Br J Haematol* 2003;121:892-896.
3. **Gobbi G**, Mirandola P, Tazzari PL, Talarico E, Caimi L, Martini G, Papa S, Conte R, Manzoli FA, Vitale M. New laboratory test in flow cytometry for the combined analysis of serologic and cellular parameters in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Cytometry* 2004;58B(1):32-38.
4. Mirandola P, Ponti C, **Gobbi G**, Sponzilli I, Vaccarezza M, Cocco L, Zauli G, Secchiero P, Manzoli FA, Vitale M. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors, but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 2004;104(8):2418-2424.
5. Vitale M, Rezzani R, **Gobbi G**, Ponti C, Matteucci A, Cacchioli A, Ruggeri Jr A, Cocco L. Phospholipase-C β 1 is predominantly expressed in the granular layer of rat cerebellar cortex. *Int J Mol Med* 2004;14(2):161-164.
6. Mirandola P, Ponti C, **Gobbi G**, Sponzilli I, Melloni E, Vitale M. The response of human natural killer cells to interleukin-2. *J Endocrinol Invest* 2004; 27: 146-150.
7. **Gobbi G**, Mirandola P, Micheloni C, Solenghi E, Sponzilli I, Artico M, Soda G, Zanelli G, Pelusi G, Fiorini T, Cocco L, Vitale M. Expression of HLA class I antigen and proteasome subunits LMP-2 and LMP-10 in primary vs. metastatic breast carcinoma lesion. *Int J Oncol* 2004; 25(6):1625-1629.
8. Vitale M, Pelusi G, Taroni B, **Gobbi G**, Micheloni C, Mezzani R, Donato F, Wang X, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in primary ovary carcinoma lesions. association with disease stage. *Clin Cancer Res* 2005; 11(1): 67-72.
9. Mirandola P, **Gobbi G**, Ponti C, Sponzilli I, Cocco L, Vitale M. PKC ϵ controls the protection against TRAIL in erythroid progenitors. *Blood* 2006; 107(2): 508-513.

10. Mirandola P, Sponzilli I, Solenghi E, Micheloni C, Rinaldi L, **Gobbi G**, Vitale M. Down-regulation of HLA class I and II and β 2-microglobulin expression in human herpesvirus-7 infected cells. *J Infect Dis* 2006; 193(7): 917-926.

11. Mirandola P, Sponzilli I, **Gobbi G**, Marmioli S, Rinaldi L, Binazzi R, Piccari GG, Mazzotti G, Gaboardi GC, Cocco L, Vitale M. Anticancer agents sensitize osteosarcoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand downmodulating IAP family proteins. *Int J Oncol* 2006; 28(1): 127-133.

12. Rinaldi L, **Gobbi G**, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN *via* inhibition of p38 and caspase 3. *Lab Invest* 2006; 86(4): 391-397.

13. Vitale M, **Gobbi G**, Mirandola P, Ponti C, Sponzilli I, Rinaldi L, Manzoli FA. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and erythropoiesis: a role for PKC ϵ . *Eur J Histochem* 2006; 50(1): 15-18.

14. **Gobbi G**, Sponzilli I, Mirandola P, Tazzari PL, Caimi L, Cacchioli A, Matteucci A, Giuliani Piccari G, Cocco L, Vitale M. Efficient platelet δ -granule release induced by $[Ca^{2+}]_i$ elevation is modulated by GPIIb/IIIa. *Int J Mol Med* 2006; 18(2): 309-313.

PKC ϵ controls protection against TRAIL in erythroid progenitors

Prisco Mirandola, Giuliana Gobbi, Cristina Ponti, Ivonne Sponzilli, Lucio Cocco, and Marco Vitale

Apoptosis plays a central role in the regulation of the size of the hematopoietic stem cell pool as well as in the processes of cell differentiation along the various hematopoietic lineages. TRAIL is a member of the TNF family of cytokines with a known apoptogenic role against a variety of malignant cells and an emerging role in the modulation of normal hematopoiesis. Here we worked on the hypothesis that PKC ϵ could act as a switch of the cellular response to TRAIL during erythropoiesis.

We demonstrate that EPO-induced erythroid CD34 cells are insensitive to the apoptogenic effect of TRAIL at day 0 due to the lack of specific receptor expression. From day 3 onward, erythroid cells express surface death receptors and become sensitive to TRAIL up to day 7/8 when, notwithstanding death-receptor expression, the EPO-driven up-regulation of PKC ϵ intracellular levels renders differentiating erythroid cells resistant to TRAIL likely via Bcl-2 up-regulation. Our conclu-

sion is that in human CD34 cells, EPO promotes a series of events that, being finely regulated in their kinetics, restricts the sensitivity of these cells to TRAIL to a specific period of time, which therefore represents the "TRAIL window" for the negative regulation of erythroid-cell numbers. (Blood. 2006;107:508-513)

© 2006 by The American Society of Hematology

Introduction

It is now well established that apoptosis plays a central role in the regulation of the size of the hematopoietic stem cell pool¹ as well as in the processes of cell differentiation along the various hematopoietic lineages. Fetal erythropoiesis can be negatively regulated by Fas ligand,^{2,3} although bone marrow hematopoiesis does not appear to be affected by Fas deficiency.³ However, Fas expression on hematopoietic stem cells or hematopoietic progenitors can be induced by certain cytokines such as IFN γ or tumor necrosis factor α (TNF α),³⁻⁵ reducing hematopoietic repopulating potential. Relatively little is known on the effects of other members of the TNF family on hematopoietic progenitors. We have demonstrated that TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) acts as a negative regulator of adult erythropoiesis, selectively reducing the number of erythroblasts in liquid culture, as well as reducing the number and size of erythroid colonies in semisolid assays.⁶ Recently, Secchiero et al demonstrated that TRAIL inhibited the generation of mature erythroblasts in liquid culture through the activation of an ERK 1/2-mediated signaling pathway.⁷

TRAIL is a member of the TNF family of cytokines, which are structurally related proteins playing important roles in regulating cell death, immune response, and inflammation.^{8,9} The unique feature of TRAIL, compared with other members of the TNF family, is its ability to induce apoptosis in a variety of malignant cells both in vitro and in vivo, displaying minimal toxicity on normal cells and tissues.^{10,11} TRAIL interacts with 4 high-affinity transmembrane receptors belonging to the apoptosis-inducing TNF-receptor (R) family. TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5)

transduce apoptotic signals on binding of TRAIL, whereas TRAIL-R3 (DcR1) and TRAIL-R4 (DcR2) are homologs to DR4 and DR5, but they lack the intracellular death domain and apoptosis-inducing capability. It has been proposed that TRAIL-R3 and TRAIL-R4 function as decoy receptors protecting normal cells from apoptosis.^{12,13}

Most normal human cell types tested to date, including bone, epithelial, endothelial, fibroblastic, and smooth muscle cells, are refractory to TRAIL. Nevertheless, TRAIL can induce hepatocyte apoptosis,¹⁴ as well as cell damage in the human prostate¹⁵ and brain.¹⁶ The earliest biochemical event following engagement of TRAIL death receptors by their ligand is the recruitment of proteins to the intracellular death domain of the receptor to form a structure known as the death-inducing signaling complex (DISC).¹⁷

Of the several known isoforms of protein kinase C, we have demonstrated that PKC ϵ is selectively posttranscriptionally down-modulated in the EPO-dependent murine 32D-Epo.1 cells, while it is expressed in the parental cell line 32D as well as in the 32D-GM1 and 32D-G1 cells with granulomacrophagic and granulocytic phenotype, respectively. The subsequent observation that the pharmacologic inhibition of PKC ϵ increased the number of erythroid colonies in vitro strongly suggested a relevant role for this isoform of PKC in erythropoiesis.¹⁸ Previous observations¹⁹ had already established a link between PKC ϵ and apoptosis in different model systems. On the basis of the observation that PKC ϵ up-regulation increased the formation and growth rate of tumors in nude mice,²⁰ Gubina et al²¹ demonstrated that PKC ϵ prevents

From the Department of Anatomy, Pharmacology, & Forensic Medicine, Human Anatomy Section, University of Parma, Ospedale Maggiore, Parma, Italy; the Department of Normal Human Morphology, University of Trieste, Italy; the Department of Anatomical Sciences, Cellular Signaling Laboratory, University of Bologna, Italy; and Istituto per i Trapianti d'Organo e Immunocitologia—Consiglio Nazionale delle Ricerche (ITOI-CNR), Bologna Unit, Italy.

Submitted July 7, 2005; accepted September 1, 2005. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, September 15, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-07-2676.

Supported by Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca—Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base (MIUR-FIRB) (RBNE0189JJ), Programmi di Ricerca Cofinanziati (COFIN), and Fondazione Cassa di

Risparmio di Parma (CARIPARMA) grants.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

Reprints: Marco Vitale, Department of Anatomy, Pharmacology, & Forensic Medicine, Human Anatomy Section, University of Parma, Ospedale Maggiore, Via Gramsci, 14, I-43100 Parma, Italy; e-mail: marco.vitale@unipr.it.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2006 by The American Society of Hematology

apoptosis of the factor-dependent TF-1 cells cultured in the absence of cytokines via Bcl-2 up-regulation.

Given this complex background, we decided to investigate the potential role of PKC ϵ in the protection against TRAIL activity during human erythropoiesis.

Materials and methods

CD34⁺ cell purification

Primary CD34⁺ cells were isolated from peripheral blood of healthy donors by immunomagnetic positive selection using the CD34⁺ cell isolation Kit (Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany) in the magnetic field of a Vario-MACS apparatus (Miltenyi Biotech), according to the manufacturer's protocol. Purity of CD34⁺ cells was immediately checked by anti-CD34-PE mAb (Beckman Coulter, Miami, FL) and flow cytometry. Only samples exceeding 95% purity were used for subsequent experiments.

Cell cultures and treatment

Purified human CD34⁺ cells were cultured up to 18 days, at an optimal cell density of 1×10^6 cell/mL, in serum-free X-vivo medium supplemented with 3 ng/mL recombinant human interleukin-3 (rIL-3) and 40 ng/mL stem cell factor (SCF), with or without 5 U/mL erythropoietin (EPO). Cytokines were read every 3 days, up to 18 days.

HeL, K562, and TF-1 cell lines were grown in 10% FBS-enriched RPMI medium at the optimal density of 0.5×10^6 cells/mL. TF-1 cells were maintained in the presence of 3 ng/mL IL-3.

IL-3, recombinant human SCF, and recombinant human EPO were all from PeproTech (London, United Kingdom). As a PKC ϵ inhibitor, we used the translocation inhibitor H-Glu-Ala-Val-Ser-Leu-Lys-Pro-Thr-OH at 250 μ g/mL for 48 hours (Calbiochem, San Diego, CA).

Flow cytometric analysis

Aliquots of 0.3×10^6 cells/experimental point were labeled by a panel of anti-TRAIL-R MoAbs (Alexis Biochemical, San Diego, CA). Expression of TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, and TRAIL-R4 was analyzed by indirect staining using 1 μ g HS101 anti-human TRAIL-R1, HS201 anti-human TRAIL-R2, HS301 anti-human TRAIL-R3, and HS401 anti-human TRAIL-R4 monoclonal antibodies, followed by PE-labeled goat anti-mouse IgG (Beckman Coulter) as a second reagent. Analysis was performed by an Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter) and Expo ADC software (Beckman Coulter).

siRNA design and transfection

Double-strand siRNAs (dsRNA) were designed to target sequences corresponding to nt's 223 to 244, 429 to 450, 942 to 963, and 1158 to 1179 on human PKC ϵ mRNA (NM005400). The target sequences were as follows: 5'-AAGAT CAAA TCTGC GAGGCC-3', 5'-AAGAT CGAGC TG-GCTG TCTTT-3', 5'-AACTA CAAGG TCCCT ACCTC-3', and 5'-AAAAA GCTCA TTGCT GGTGCC-3'.

The respective sense and antisense RNA sequences were synthesized by Silencer siRNA Construction Kit (Ambion, Austin, TX).²² Nonspecific siRNA duplexes containing the same nucleotides, but in irregular sequence (ie, scrambled PKC ϵ siRNA), were prepared according to the manufacturer's protocol and used as controls.

The GFP-PKC ϵ expression and control plasmid were kindly provided by Professor Peter Parker (Cancer Research UK, London Research Institute).

To maximize transfection efficiency, siRNAs (100 nM each) and GFP-PKC ϵ plasmids (1 μ g/transfection) were delivered using the Amaxa nucleofection technology (Amaxa, Koeln, Germany) according to the manufacturer's protocols.

Semiquantitative reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed with Malone murine

leukemia virus (MMV) reverse transcriptase, and progressive dilutions (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000) were subjected to PCR amplification to detect β -actin and PKC ϵ cDNA.

PCR was performed under the following reaction conditions: 95°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 5 minutes. We used 35 cycles of amplification. The sequence of primers used for PCR was as follows: β -actin, 5'-TGACG GGGTC ACCCA CACTG TGCCC ATCTA-3' (sense) and 5'-CTAGA AGCAT TTGCG GTGGA CGATG GAGGG-3' (antisense); PKC ϵ , 5'-CAATGGC CTTCTTAAG ATCAAAA-3' (sense) and 5'-CCTGA GAGATC GATGATC ACATAC-3' (antisense).

Western blot

Cultured cells were counted and 2×10^6 cells were collected at specific time points, washed in PBS, and centrifuged at 200g for 10 minutes. Pellets were resuspended in a cell-lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% sodium deoxycholate; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM NaF) supplemented with fresh protease inhibitors, and protein concentration was determined using BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Proteins from each sample (14 μ g) were then migrated in 5% SDS-acrylamide gels and blotted onto nitrocellulose filters.

Blotted filters were blocked and incubated with specific primary antibodies diluted as described in the manufacturers' protocols. Specifically, rabbit polyclonal anti-PKC ϵ and anti-phospho-PKC ϵ antibodies (Upstate, Lake Placid, NY) were used at the concentration of 1 μ g/mL. MoAbs anti-PKC δ (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti- β -actin, and anti- β -tubulin (Sigma, St Louis, MO) were diluted 1:500, 1:50, 1:5000, and 1:20 000, respectively. Anti-Bax rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) was diluted 1:1000 before use.

Filters were washed and further incubated for 1.5 hours at room temperature with 1:5000 peroxidase-conjugated anti-rabbit or with 1:2000 peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Pierce) in the primary antibody working solution at room temperature. Specific reactions were revealed with the ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate detection system (Pierce).

Assessment of apoptosis

Cell-culture viability was assessed by trypan blue exclusion. Apoptotic cells were identified by flow cytometry as subdiploid peaks generated either by DNA fragmentation or by annexin V/PI staining. Briefly, cells were permeabilized by ethanol in the presence of RNase H buffer and stained with 50 μ g/mL propidium iodide, or phosphatidylserine was stained by FITC conjugate annexin V (ACTIPLATE; Valter Occhiena, Torino, Italy) in Ca²⁺ and PI staining buffer, following the manufacturer's protocol.

Results

TRAIL induces apoptosis in human erythromyeloid cell lines

The human erythromyeloid cell lines HeL, K562, and TF-1 all expressed at different levels surface glycoprotein A. The phenotypic analysis with anti-TRAIL-receptor (TRAIL-R) moAbs revealed that the 3 cell lines express all the receptors, with a very neat expression of death receptors R1 and R2 in HeL and K562 cells, and a lower expression of R2 in TF-1 cells (Figure 1A). After 48 hours of treatment with 50 ng/mL TRAIL, apoptosis was induced in all 3 cell lines (HeL: $52.3\% \pm 9.1$; K562: $49.6\% \pm 5.0$; and TF-1: $50.2\% \pm 9.1$; data are expressed as mean percentages of annexin V⁺ cells \pm SD of 3 independent experiments) as detected by annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry (Figure 1B).

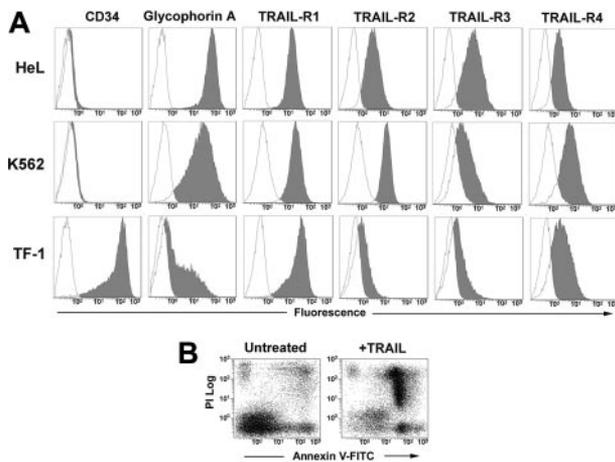


Figure 1. Phenotype of erythroleukemic cell lines and their sensitivity to TRAIL. (A) HeL, K562, and TF-1 cells were stained with anti-CD34, anti-glycophorin A, and with specific MoAbs to TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, and TRAIL-R4 as described in "Materials and methods." Specific fluorescence histograms (gray) are superimposed to negative controls (empty histograms). (B) TRAIL-induced apoptosis of TF-1 cells treated for 48 hours with 50 ng/mL TRAIL. Apoptosis was detected by staining cells with annexin V-FITC and PI.

PKC ϵ reduces TRAIL-mediated apoptosis in human erythromyeloid cell lines

On the basis of the known prosurvival effects of PKC ϵ on TF-1 cells²¹ and its protection against TRAIL-mediated apoptosis in glioma cells,²³ we performed a series of experiments to investigate whether PKC ϵ could modulate the sensitivity of erythromyeloid cell lines to the apoptogenic effects of TRAIL. For this purpose, we first overexpressed PKC ϵ in our cell lines, using as negative control an inactive PKC ϵ K522M mutated (PKC ϵ_m) kinase.²⁴ As shown in Figure 2A, both PKC ϵ and PKC ϵ_m could be very well overexpressed in the 3 cell lines, and both the wild-type and mutated forms of the enzyme could be phosphorylated, as revealed by immunoblotting with anti-phospho-PKC ϵ antibody. As PKC ϵ overexpression did not modify the surface expression of TRAIL-Rs in either cell line (Figure 2B), we treated transfected and mock K562, HeL, and TF-1 cell lines with 50 ng/mL TRAIL for 48 hours. Figure 2C shows a significant reduction of TRAIL-mediated apoptosis in all 3 cell lines overexpressing PKC ϵ , but not PKC ϵ_m .

TRAIL induces apoptosis of CD34-derived erythroblasts

Human peripheral-blood-purified CD34 cells were first analyzed for the surface expression of TRAIL-Rs. Figure 3 shows that none of the 4 TRAIL-Rs is expressed on freshly purified CD34 cells. However, when cultured in serum-free medium in the presence of IL-3, SCF, and EPO, starting from day 3 CD34 cells showed a progressive increase of the surface expression of TRAIL-R1 and TRAIL-R2. On the contrary, TRAIL decoy receptors were hardly expressed at all, with the exception of a transient expression of TRAIL-R4 around day 13. Accordingly, when TRAIL was added to EPO-cultured CD34 cells, they were resistant to apoptosis at day 0. Starting at day 3, cells became sensitive to the apoptogenic effect of TRAIL (Figure 4A-B). Surprisingly, however, notwithstanding the stable surface expression of TRAIL death receptors (and in the virtual absence of TRAIL-decoy receptor expression), the sensitivity to TRAIL of EPO-differentiating CD34 cells decreased progressively from day 7 onward, and from day 10 erythroblasts became resistant to TRAIL (Figure 4B). Control cultures of purified CD34 cells in the absence of EPO were always resistant to the apoptogenic effect of TRAIL (Figure 4C), confirming that the

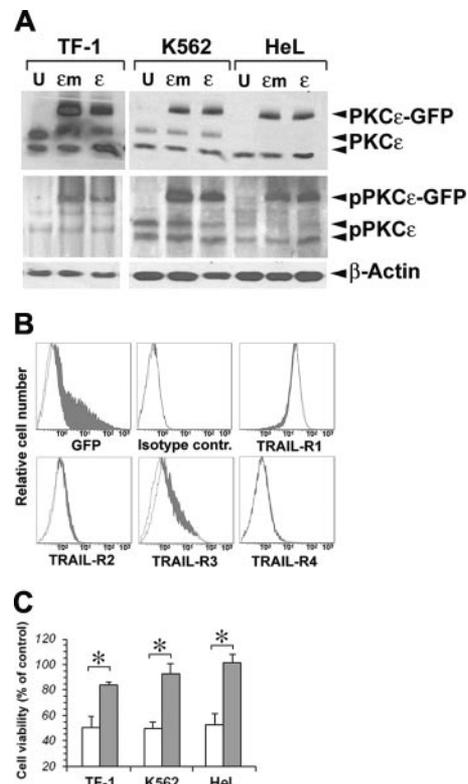


Figure 2. Transfection of PKC ϵ and PKC ϵ_m in erythroleukemic cell lines. (A) Detection of exogenous PKC ϵ -GFP and endogenous wild-type PKC ϵ protein by Western blot. Phosphorylated PKC ϵ (pPKC ϵ) was detected by specific C-terminal anti-phospho-Ser729 antibody. β -Actin was monitored for protein loading. (B) Cell-surface expression of TRAIL-Rs after PKC ϵ transfection. TF-1 cells were transfected with PKC ϵ -GFP (filled histograms) or PKC ϵ_m -GFP (open histograms), and TRAIL-R expression was monitored by flow cytometry 48 hours later. (C) PKC ϵ reduces the sensitivity of erythroleukemic cell lines to TRAIL-induced apoptosis. K562, HeL, and TF-1 cell lines were transfected with PKC ϵ (■) or with PKC ϵ_m (□) and 48 hours later were treated with 50 ng/mL TRAIL. Residual cell viability was analyzed by flow cytometry, staining cells with annexin V-FITC and PI. The mean of 3 independent experiments is reported as percentage of control. Controls were represented by mock-transfected cell lines treated with TRAIL. * $P < .05$.

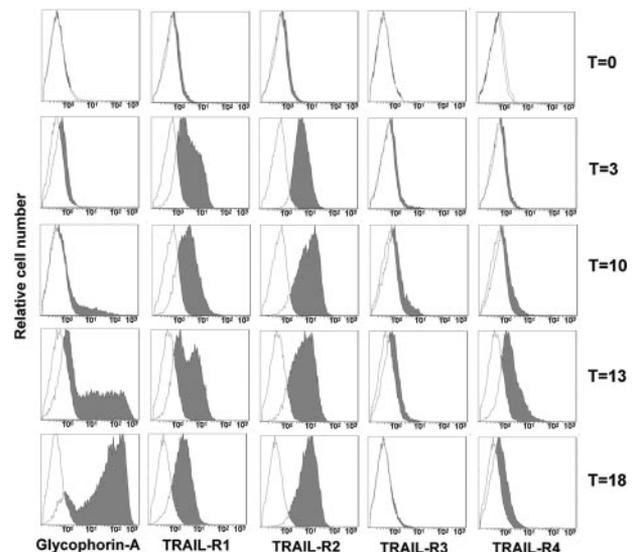


Figure 3. TRAIL-R expression of CD34-derived erythroblasts. CD34 purified cells were cultured for 18 days in serum-free medium with EPO, SCF, and IL-3, showing a progressive expression of glycophorin A. At the indicated time intervals (T), TRAIL-R expression was evaluated by specific MoAb staining. Filled histograms indicate specific fluorescence; open histograms, isotype-matched irrelevant Ab, negative control.

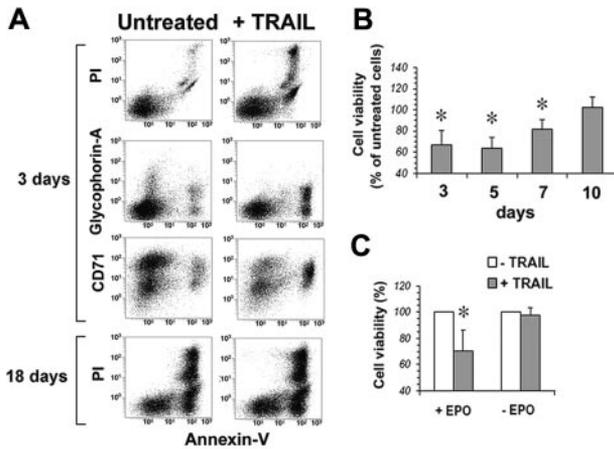


Figure 4. TRAIL kills EPO-responsive CD34 cells. (A) Flow cytometric analysis of CD34 cells at day 3 and day 18 of culture (EPO, SCF, and IL-3) treated with 50 ng/mL TRAIL for 48 hours; residual cell viability was evaluated by staining cells with annexin V–FITC and PI, while cell differentiation was monitored by glycophorin A–PE and CD71–CY5 expression. (B) CD34-derived erythroblast sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. At the indicated time intervals, cells were treated for 48 hours with 50 ng/mL TRAIL, and the percentage of residual cell viability was monitored by staining with annexin V–FITC and PI. Each histogram is the mean of 3 independent experiments expressed as percentages of control (CD34 cells cultured without TRAIL), **P* < .05. (C) Sensitivity to TRAIL of CD34 cells cultured 3 days with IL-3 and SCF in serum-free medium with (+EPO) or without (–EPO) EPO. Data are expressed as percentages of TRAIL-untreated cells (3 independent experiments, **P* < .05).

sensitivity to TRAIL of normal CD34 cells between day 3 and day 7 was EPO dependent.

EPO-mediated up-regulation of PKC ϵ is responsible for TRAIL resistance of human CD34-derived erythroblasts

Our next question was therefore if PKC ϵ could be implicated in the observed resistance to TRAIL of erythroblasts from day 10 onward. Figure 5A–B shows the kinetic of PKC ϵ induction in our primary CD34 cell cultures in the presence or absence of EPO.

To formally prove that the induction of PKC ϵ in EPO-cultured erythroblasts was responsible for their resistance to TRAIL, we first pharmacologically inhibited PKC ϵ by the selective inhibitor of PKC ϵ translocation.^{6,18} Figure 5C shows that PKC ϵ inhibition increases TRAIL-induced cell death both in cell lines and in day-10 CD34 cells. Subsequently, we designed and successfully transfected in HeL and K562 cells siRNAs targeting PKC ϵ mRNA. Figure 5D shows a semiquantitative RT-PCR analysis of HeL cells treated with anti-PKC ϵ siRNA, showing a more than 100-fold decrease of specific cDNA amplification. Specific targeting of PKC ϵ mRNA with consequent protein synthesis inhibition (Figure 5E) sensitized both HeL and K562 cells to TRAIL-induced apoptosis (Figure 5F). Finally, we overexpressed PKC ϵ in CD34 cells differentiated with EPO for 3 days, observing acquired resistance to the apoptogenic effect of TRAIL, while PKC ϵ_{m} -transfected CD34 cells did not (Figure 5G).

PKC ϵ modulates Bcl-2 levels in erythroid progenitors

Given that the general activation of PKC by PMA does not affect TRAIL-R aggregation at the cell surface,²⁵ and that overexpression of PKC ϵ does not modulate TRAIL-R surface density, we looked at Bcl-2 levels as one possible antiapoptotic factor involved in the protection of erythroid progenitor cells.

Starting experiments on primary CD34-derived erythroblasts are shown in Figure 6A. Kinetic analysis of Bcl-2 expression during EPO-driven erythroid maturation showed an up-regulation of the protein expression at day 14, while Bax levels remained constant.

Since it had been previously demonstrated that Bcl-2 levels could be modulated by PKC ϵ ,²¹ we either inhibited or overexpressed PKC ϵ in our cell lines and subsequently immunoblotted for Bcl-2. Results show that siRNA-mediated downmodulation of PKC ϵ induces a reduction of Bcl-2 protein expression (Figure 6B), while PKC ϵ , but not PKC ϵ_{m} , overexpression increases Bcl-2 protein levels (Figure 6C).

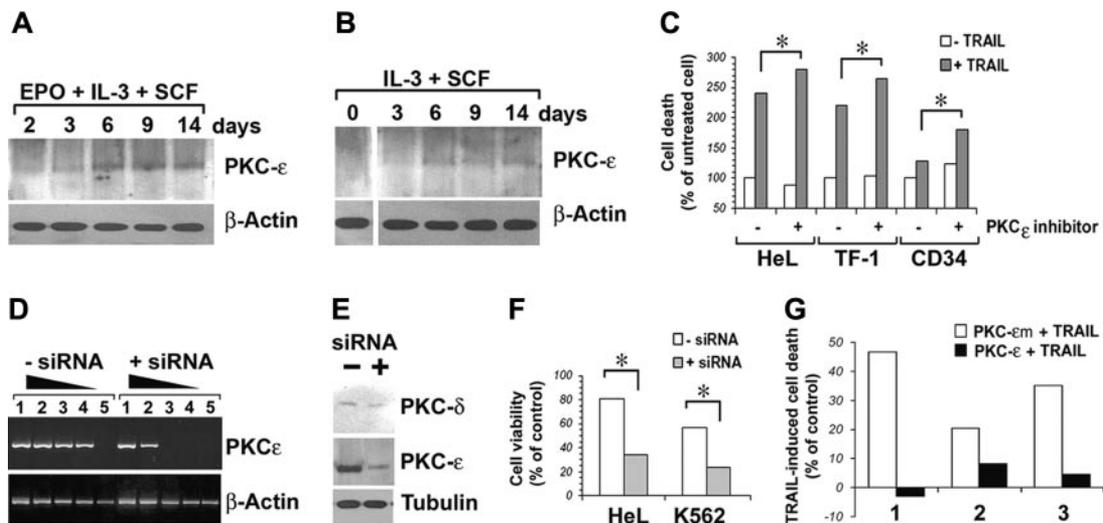


Figure 5. Induction of PKC ϵ and its effects on TRAIL-induced apoptosis in human erythroblasts. (A–B) Western blot detection of total PKC ϵ protein expression in CD34 cells cultured in serum-free medium with the indicated cytokines. β -Actin was monitored for protein loading. (C) TRAIL-induced apoptosis in cells pretreated for 48 hours with 250 μ g/mL PKC ϵ inhibitor (+) or control peptide (–). Cell death is expressed as percentage of controls. (D) Semiquantitative RT-PCR analysis of residual PKC ϵ mRNA expression after PKC ϵ -siRNA transfection. RNA was recovered 48 hours after siRNA transfection. Lanes 1 to 5: PCRs of 10^{-1} to 10^{-5} dilutions of total cDNA obtained from 1 μ g reverse-transcribed total RNA. (E) Western blot analysis of residual PKC ϵ protein expression after PKC ϵ -siRNA transfection. PKC- δ was used as control for PKC ϵ -siRNA specificity. (F) PKC ϵ -siRNA transfection increases cell sensitivity to TRAIL. Residual cell viability of erythroid cell lines HeL and K562 treated with PKC ϵ -siRNA and challenged with TRAIL is reported as percentage of controls (some samples, in absence of TRAIL). Mean of 3 independent experiments is reported. **P* < .05. (G) PKC ϵ overexpression reduces TRAIL sensitivity of CD34-derived erythroblast. CD34 cells, derived from 3 unrelated donors and cultured with IL-3, SCF, and EPO for 24 hours, were transfected with GFP-PKC ϵ or GFP-PKC ϵ_{m} . Forty-eight hours later, cells were treated with 50 ng/mL TRAIL. Apoptosis was monitored 48 hours after TRAIL treatment, staining cells with annexin V–FITC and PI. TRAIL-induced cell death is reported as percentage of controls (mock-transfected CD34 cells from the same patients).

Discussion

Early erythroid progenitor cells are largely quiescent and require EPO to enter cell cycle, while late erythroid progenitors essentially require EPO as a survival factor that allows them to reach terminal differentiation. In vivo, physiologic EPO concentrations are suboptimal, causing apoptosis of about 20% of the bone marrow erythroid cells.²⁶ It is now well established that erythroid differentiation can be further negatively regulated by death-receptor ligands present in the marrow microenvironment, such as Fas and TRAIL.

We demonstrate that, in differentiating erythroid progenitors, PKC ϵ levels are regulated by EPO and control the protection against the apoptogenic effect of TRAIL. PKC ϵ is important for cytokine and growth factor receptor–mediated signaling. This has been demonstrated by the observations that loss of PKC ϵ results in a severely attenuated response of macrophages to LPS and IFN γ in PKC $\epsilon^{-/-}$ animals, as well as in impaired PDGF-receptor signaling.^{27,28} It has also been demonstrated that PKC ϵ acts as a link between the integrin and IFN γ signaling pathways.²⁹ We had previously demonstrated, indeed, that PKC ϵ was one of the PKC isoforms modulated during human and mouse erythroid-cell differentiation¹⁸ and that TRAIL, as one of the TNF family members, could negatively regulate erythropoiesis.⁶ The data that we describe in this paper demonstrate that EPO promotes in human CD34 cells a series of events that, being finely regulated in their kinetics, determine the sensitivity of these cells to TRAIL. In fact at day 0, CD34 cells are insensitive to TRAIL because they do not express death receptors on the cell surface. PKC ϵ is virtually absent at this early stage of differentiation. From day 3 onward, differentiating erythroid progenitors express surface death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2, while PKC ϵ levels are still undetectable. Cells become sensitive to TRAIL, and overexpression of PKC ϵ at this stage abrogates TRAIL-induced apoptosis. Around day 7/8, PKC ϵ levels increase rapidly, while surface death-receptor expression remains stable. PKC ϵ induction is EPO dependent, since control CD34 cells cultured in the presence of SCF + IL-3 do not up-regulate PKC ϵ synthesis. The induction of PKC ϵ levels confers to erythroid cells resistance to TRAIL, notwithstanding the surface

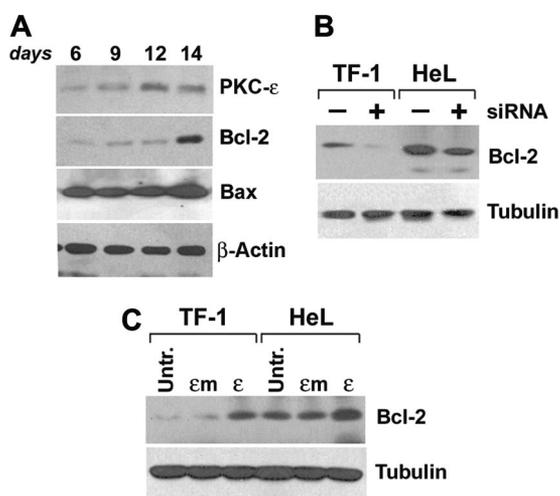


Figure 6. PKC ϵ modulates Bcl-2 levels. (A) CD34-derived erythroblasts were cultured with IL-3, SCF, and EPO up to 14 days and total Bcl-2, PKC ϵ , and Bax protein expression levels were monitored at the indicated times by Western blot. (B) Western blot of Bcl-2 in TF-1 and HeL cell lines in the presence (+) or absence (–) of PKC ϵ -specific siRNA. (C) Western blot of Bcl-2 in TF-1 and HeL cell lines overexpressing wild-type (ϵ) or mutated (ϵ m) PKC ϵ .

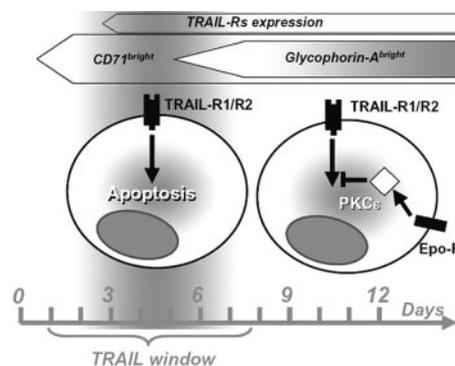


Figure 7. Proposed scheme of the period of sensitivity to TRAIL (“TRAIL window”) along human erythroid differentiation and the role of PKC ϵ in the downstream intracellular signaling pathway.

expression of death receptors and the virtual absence of surface decoy receptors. The resistance to apoptosis is dependent on PKC ϵ induction, since both silencing of PKC ϵ mRNA with consequent downmodulation of the protein synthesis and pharmacologic inhibition of PKC ϵ activation are able to restore cell sensitivity to TRAIL. Very recently, Gillespie et al³⁰ have shown that PKC ϵ levels are correlated with the sensitivity of melanoma cell lines to TRAIL, suggesting that PKC ϵ might have a general role in the fine tuning of the signaling emanating from death-receptor triggering.

Our data show that the antiapoptotic molecule Bcl-2 is a candidate mediator of erythroid-cell resistance to TRAIL. Bcl-2 levels are in fact up-regulated in erythroid progenitors with a kinetic that is compatible with that of EPO-driven PKC ϵ induction. The observation of the reciprocal effects of PKC ϵ downmodulation or overexpression on Bcl-2 levels in our model system demonstrates that Bcl-2 is modulated by PKC ϵ levels. Indeed, these data parallel those from Gubina et al²¹ that demonstrated that the overexpression of PKC ϵ in the TF-1 cell line was able to induce Bcl-2 expression. However, we cannot exclude that other antiapoptotic intermediates could counteract the effects of TRAIL. For example, although in our experiments Bax levels remained constant, McJilton et al³¹ demonstrated that in the human prostate cancer cell line LNCaP, PKC ϵ could interact with Bax blocking its conformational changes required for the mitochondrial death-signaling pathway.

Altogether, our data prompt us to hypothesize a progression of the differentiating erythroid progenitor through an initial phase of resistance to TRAIL (due to the lack of specific surface-receptor expression), followed by a period of sensitivity that ends around day 7, due to the EPO-driven up-regulation of PKC ϵ with downstream positive effects on Bcl-2 (Figure 7).

PKC ϵ therefore is a novel quantitative regulator of EPO-dependent cell expansion and survival in erythropoiesis, similarly to what was recently suggested by Schmidt et al³² for Btk.

It will be therefore important to re-examine the pathophysiology of diseases such as myelodysplastic syndrome (MDS), characterized by an enhanced response to death ligands, in the light of PKC ϵ levels as key regulators of the physiologic cellular response to TRAIL.

Acknowledgments

We are grateful to Instrumentation Laboratory, Italy, for technical support and to Vincenzo Palermo, Domenico Manfredi, and Davide Dallatana for technical support.

References

- Domen J. The role of apoptosis in regulating hematopoietic stem cell numbers. *Apoptosis*. 2001;6:239-252.
- Barcena A, Muench MO, Song KS, Ohkubo T, Harrison MR. Role of CD95/Fas and its ligand in the regulation of the growth of human CD34(++)CD38(-) fetal liver cells. *Exp Hematol*. 1999;27:1428-1439.
- Schneider E, Moreau G, Arnould A, et al. Increased fetal and extramedullary hematopoiesis in Fas-deficient C57BL/6-lpr/lpr mice. *Blood*. 1999;94:2613-2621.
- Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood*. 1995;85:3183-3190.
- Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, et al. In vitro expansion of hematopoietic progenitor cells induces functional expression of Fas antigen (CD95). *Blood*. 1996;88:2871-2877.
- Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*. 2000;95:3716-3724.
- Secchiero P, Melloni E, Heikinheimo M, et al. TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood*. 2004;103:517-522.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3:673-682.
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*. 2003;10:66-75.
- Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H. Nature's TRAIL: on a path to cancer immunotherapy. *Immunity*. 2003;18:1-6.
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med*. 2002;195:161-169.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277:818-821.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:255-260.
- Jo M, Kim TH, Seol DW, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med*. 2000;6:564-567.
- Nesterov A, Ivashchenko Y, Kraft AS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene*. 2002;21:1135-1140.
- Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, et al. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet*. 2000;356:827-828.
- MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*. 2003;139:89-97.
- Bassini A, Zauli G, Migliaccio G, et al. Lineage-restricted expression of protein kinase C isoforms in hematopoiesis. *Blood*. 1999;93:1178-1188.
- Baxter GT, Miller DL, Kuo RC, Wada HG, Owicki JC. PKC epsilon is involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signal transduction: evidence from microphysiometry and antisense oligonucleotide experiments. *Biochemistry*. 1992;31:10950-10954.
- Cacace AM, Ueffing M, Philipp A, Han EK, Kolch W, Weinstein IB. PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene*. 1996;13:2517-2526.
- Gubina E, Rinaudo MS, Szallasi Z, Blumberg PM, Mufson RA. Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and induces bcl-2 expression. *Blood*. 1998;91:823-829.
- Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, et al. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2004;104:2418-2424.
- Shinohara H, Kayagaki N, Yagita H, et al. A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:1162-1167.
- Ivaska J, Whelan RD, Watson R, Parker PJ. PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J*. 2002;21:3608-3619.
- Harper N, Hughes MA, Farrow SN, Cohen GM, MacFarlane M. Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003;278:44338-44347.
- Shetty V, Hussaini S, Broady-Robinson L, et al. Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood*. 2000;96:1388-1392.
- Castrillo A, Pennington DJ, Otto F, Parker PJ, Owen MJ, Bosca L. Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med*. 2001;194:1231-1242.
- Saito Y, Hojo Y, Tanimoto T, Abe J, Berk BC. Protein kinase C-alpha and protein kinase C-epsilon are required for Grb2-associated binder-1 tyrosine phosphorylation in response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 2002;277:23216-23222.
- Ivaska J, Bosca L, Parker PJ. PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat Cell Biol*. 2003;5:363-369.
- Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:668-676.
- McJilton MA, Van Sikes C, Wescott GG, et al. Protein kinase Cepsilon interacts with Bax and promotes survival of human prostate cancer cells. *Oncogene*. 2003;22:7958-7968.
- Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, et al. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med*. 2004;199:785-795.

be defined may provide a heretofore unidentified environment of protection from cancerogenesis. Furthermore, the worldwide occurrence of this mutation that causes decreased survival in homozygotes must provide some type of survival advantage for heterozygotes. Perrotta and colleagues' identification of the high prevalence of this mutation provides a valuable opportunity to more completely delineate the phenotype and clinical consequences of augmented hypoxia sensing. We submit that the functional significance of the *VHL 598C>T* mutation and inherited hypoxia sensing in general can now be better and more quickly delineated by studying 2 populations of different racial backgrounds that live in distinct environments. The outcome of parallel studies in Chuvashia and Ischia could rapidly improve our understanding of the role

of HIF in conditions such as innate immunity, thrombosis, cancerogenesis, and perhaps preeclampsia.⁵ ■

REFERENCES

1. Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, et al. Congenital disorder of oxygen-sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood*. 2004;103:3924-3932.
2. Ang SO, Chen H, Gordeuk VR, et al. Endemic polycythemia in Russia: mutation in the VHL gene. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;28:57-62.
3. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:176-182.
4. Liu E, Percy MJ, Amos C, et al. The worldwide distribution of the VHL 598C>T mutation indicates a single founding event. *Blood*. 2004;103:1936-1939.
5. Gordeuk VR, Stockton DW, Prchal JT. Congenital polycythemia/erythrocytoses. *Haematologica*. 2005;90:109-116.

● ● ● HEMATOPOIESIS

Comment on Mirandola et al, page 508

Closing the TRAIL to the DISC

Robert T. Means Jr VA MEDICAL CENTER; THE UNIVERSITY OF KENTUCKY MARKEY CANCER CENTER

Sensitivity of erythroid progenitors to TRAIL-induced apoptosis is limited to a period initiated by TRAIL receptor expression and terminated by PKC ϵ up-regulation.

In 1990, Koury and Bondurant reported that erythropoietin (EPO) prevents apoptosis of erythroid progenitors, and that this was a major part of its role in erythropoiesis.¹ A large

number of subsequent studies have confirmed that apoptosis is a central regulator of hematopoietic differentiation and of the size of the hematopoietic progenitor and stem cell populations.

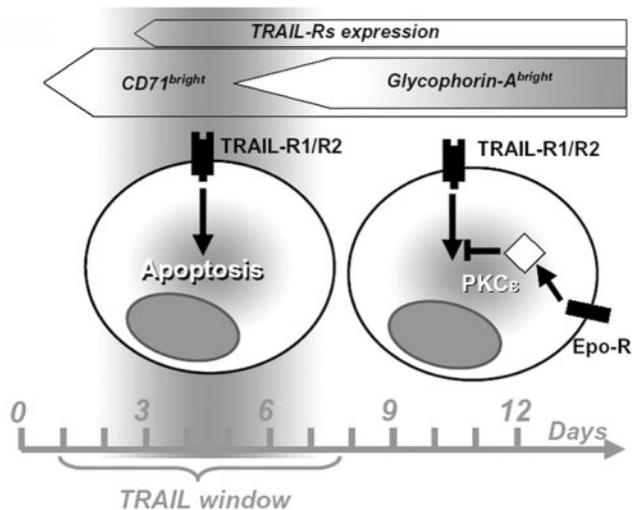
Many hematopoietic growth factors and cytokines exert their effects by activating mediators that either oppose or promote apoptosis, such as Bcl-2 or Fas. However, the response to any particular cytokine is not uniform at all points throughout hematopoiesis: one obvious example is that early erythroid progenitors are less sensitive to EPO than are later progenitors.

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

(TRAIL) is a member of the TNF cytokine family that appears to play a key role in the body's normal defenses against neoplasia. TRAIL interacts with specific membrane-spanning receptors, some of which are involved in the induction of apoptosis (TRAIL-R1 and TRAIL-R2, the "death receptors"), while others function as decoys (TRAIL-R3 and TRAIL-R4) and do not result in apoptosis. The differential receptor response is presumably responsible for the relative selectivity of TRAIL effects in different cell lineages. The binding of TRAIL to a death receptor leads to intracellular events culminating in the formation of the "death-inducing signaling complex" (DISC), and subsequent apoptosis.² While TRAIL does appear to have some selectivity for malignant cells, it has been demonstrated that TRAIL also plays a role as a negative regulator of normal erythropoiesis,³ and may be strongly implicated in the impaired erythropoietic response seen in nonerythroid diseases such as multiple myeloma.⁴

In a report in this issue, Mirandola and colleagues have studied the inhibitory effect of TRAIL on erythropoiesis using CD34⁺ cells from healthy donors as well as human erythroleukemic cell lines. The authors find that TRAIL induces apoptosis in primary cells and in cell lines, but that sensitivity to TRAIL starts on day 3 when TRAIL death receptors are first expressed, and decreases around day 7, despite the continuing presence of these receptors. The event that appears to be responsible for the progressive decline in TRAIL sensitivity is EPO-driven up-regulation of PKC ϵ , which in turn modulates Bcl-2 levels. The possibility that other antiapoptotic mediators may also be involved was not ruled out. The authors propose that sensitivity to the apoptotic effects of TRAIL is limited to a specific period during the progression of erythroid differentiation (see figure).

In addition to demonstrating yet another aspect of the complex balance that composes erythropoiesis and how EPO remains the primary regulator of that balance, the report by Mirandola and colleagues raises interesting questions as to whether modulation of PKC ϵ levels in hematopoietic progenitors may play a role in the management of the cytopenias observed in diseases associated with death receptor activity, such as multiple myeloma⁴ or the myelodysplastic syndromes.⁵ ■



Proposed scheme of the period of sensitivity to TRAIL ("TRAIL window") along human erythroid differentiation and the role of PKC ϵ in the downstream intracellular signaling pathway. See the complete figure in the article beginning on page 508.

REFERENCES

1. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells. *Science*. 1990;248:378-381.
2. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*. 2003;139:89-97.
3. Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*. 2000;95:3716-3724.

4. Silvestris F, Cafforio P, Tucci M, Dammacco F. Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) highly malignant plasma cells: a major pathogenic mechanism of anemia in multiple myeloma. *Blood*. 2002;99:1305-1313.
5. Zang DY, Goodwin RG, Loken MR, Bryant E, Deeg HJ. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis. *Blood*. 2001;98:3058-3065.

● ● ● HEMOSTASIS

Comment on Licht et al, page 584

EC does it with HIF

Gregg L. Semenza THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

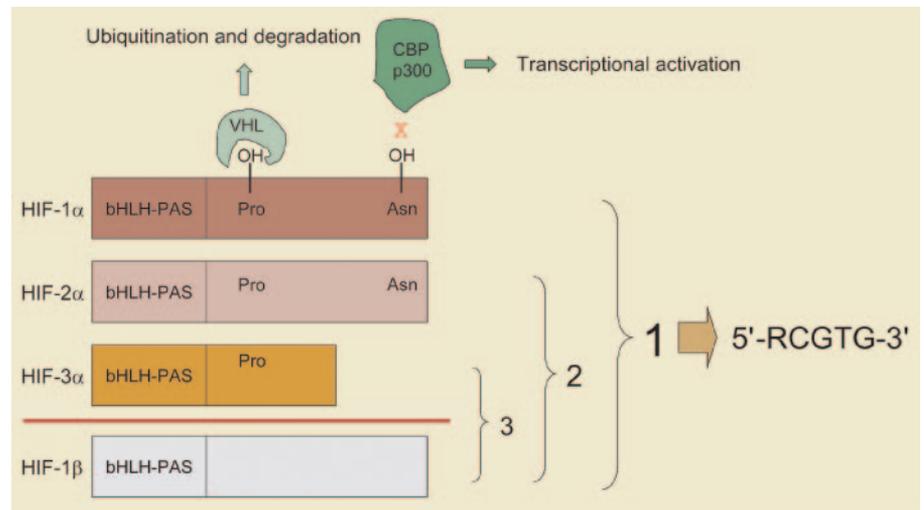
Expression of a dominant-negative form of hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) in endothelial cells (ECs) disrupts cardiovascular development in mouse embryos, providing further evidence that HIFs exert both non-cell-autonomous and cell-autonomous control over ECs.

The developmental and physiologic processes that regulate O₂ homeostasis in metazoans are directed by a family of hypoxia-inducible factors (HIFs), the prototype of which (HIF-1) was identified in 1992 as a mediator of erythropoietin gene transcription in hypoxic cells.¹ Biochemical and molecular analyses revealed that HIF-1 was a heterodimer of constitutively expressed HIF-1 β and O₂-regulated HIF-1 α subunits. Database searches identified HIF-2 α , which dimerizes with HIF-1 β and transactivates an overlapping but distinct set of genes from those regulated by HIF-1.² In contrast to the ubiquitous expression of HIF-1 α and HIF-1 β , the expression of HIF-2 α is tissue specific, most notably within vascular endothelial cells (ECs). HIF-3 α is another family member that dimerizes with HIF-1 β . HIF-1 α and HIF-2 α , but not HIF-3 α , contain transactivation domains that interact with the coactivator proteins CBP and p300 (see figure). The half-life of HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-3 α is regulated by O₂-dependent hydroxylation of prolyl residues, which is necessary for binding of the von Hippel-Lindau protein, the recognition component of an E3-ubiquitin ligase that targets the proteins for proteasomal degradation.³ In addition, hydroxylation of an asparaginyl residue in HIF-1 α and HIF-2 α blocks their interaction with coactivators. Because O₂ is a rate-limiting substrate for HIF asparaginyl and prolyl hydroxylases, changes in oxygenation are transduced into changes in transcription.

HIF-1 regulates genes encoding angiogenic cytokines, including vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor, angiopoietins 1 and 2, and stromal-derived factor 1, providing a mechanism by which cells are assured of adequate perfusion, as hypoxia-induced VEGF stimulates angiogenesis. Thus, HIF-1 was viewed as an extrinsic (non-

cell-autonomous) regulator of ECs and their progenitors, which express VEGFR2 (Flk-1), VEGFR1 (Flt-1), Tie2, and CXCR4, the cell-surface receptors for VEGF, PLGF, angiopoietins, and SDF-1, respectively. HIF-2 was thought to function as an intrinsic (cell-autonomous) regulator of ECs. However, HIF-1 regulates the expression of hundreds of genes in ECs,⁴ and tumor angiogenesis is significantly impaired in mice with EC-specific loss of HIF-1 α .⁵ Mice completely lacking HIF-2 α expression have normal cardiovascular development in certain genetic backgrounds,⁶ whereas complete HIF-1 α deficiency results in major defects in cardiovascular development.¹

A logical conclusion is that HIF-1 α and HIF-2 α play critical and partially overlapping roles in ECs. To test this hypothesis, Licht and colleagues generated transgenic mice with EC-specific expression of a dominant-negative form of HIF-2 α (HIFdn) directed by *Flk1* gene promoter/enhancer elements. Overexpressed HIFdn competes with HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-3 α for dimerization with HIF-1 β , but the dimers cannot bind DNA or activate transcription. HIFdn transgenic embryos manifested cardiovascular defects similar to those of Tie2-deficient mice and the embryos completely lacked Tie2 expression.



Mammalian hypoxia-inducible factors. HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , and HIF-1 β are each encoded by a distinct gene, with alternative mRNA splicing generating multiple isoforms (not shown) of HIF-1 α , HIF-3 α , and HIF-1 β . HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-3 α dimerize with HIF-1 β to form the functional proteins HIF-1, HIF-2, and HIF-3, respectively. The basic-helix-loop-helix (bHLH)-PAS domains mediate dimerization and DNA binding. All known HIF-1 binding sites contain the core DNA sequence 5'-RCGTG-3' (R, A, or G). Hydroxylation of prolyl residues (402 and 564 in human HIF-1 α) is required for the binding of the von Hippel-Lindau protein (VHL), which targets the proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. Hydroxylation of an asparagine residue (803 in human HIF-1 α) blocks the binding of coactivators p300 and CBP. The HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases use O₂ and α -ketoglutarate and generate CO₂ and succinate as by-products.