

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche Umane e Molecolari

Settore Disciplinare BIO/16

Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e

Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore

**STUDIO DELLE VIE DI TRASDUZIONE DEL
SEGNALE INOSITIDE-DIPENDENTE NELLE
SINDROMI MIELODISPLASTICHE**

Tesi di Dottorato

Tutore:

CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

Presentata da:

DOTT.SSA MATILDE YUNG FOLLO

XIX Ciclo

Anno Accademico 2005/2006

INDICE

Introduzione	3
1. Sindromi Mielodisplastiche (MDS)	4
1.1. Trattamento delle MDS: 5'-azacitidina	8
2. Signalling Inositide-Dipendente: Fosfolipasi c β 1 (PI-PLC β 1)	10
2.1 Struttura del Gene della PI-PLC β 1	11
2.2 Struttura Proteica della PI-PLC β 1	12
3. Asse di Attivazione Fosfoinositide-3-Chinasi (PI3K)/Akt	14
3.1 Isoforme di Akt	16
3.2. Ruolo di Akt nei Disordini Ematopoietici	18
3.3. Ruolo di Akt nei Meccanismi Apoptotici	19
3.4. Ruolo di Akt nella Progressione attraverso il Ciclo Cellulare	20
4. Target Molecolari a Valle di Akt: mTOR, 4E-BP1 e p70S6K	21
Scopo della Ricerca	23
Materiali e Metodi	25
1. Colture Cellulari <i>in vitro</i>	26
2. Caratteristiche dei Pazienti	26
3. Separazione delle Cellule Mononucleate	26
4. Ibridazione Fluorescente in Situ (FISH)	27
5. Estrazione del DNA ed Analisi Mutazionale	28
6. Estrazione dell'RNA e Sintesi del cDNA	28
7. Real-Time PCR	28
8. Analisi Immunocitochimica	29
9. Separazione delle Cellule CD33	31
10. Analisi Citofluorimetrica per la Quantificazione dell'Apoptosi	31
11. Analisi Citofluorimetrica per l'Analisi del Fenotipo	32
12. Separazione delle Cellule CD34	33
13. Saggio Clonogenico	33
14. Preparazione del Lisato Proteico Totale	34
15. Western Blotting	35

Risultati	37
1. Caratteristiche dei Pazienti	38
2. Analisi FISH	38
3. Analisi della Sequenza del Gene della PI-PLC β 1 nei Pazienti affetti da MDS ad Alto Rischio	41
4. Geni di Riferimento per la Reazione di Real-Time PCR	43
5. Espressione Genica delle Forme Trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b nei Donatori Sani e nelle Cellule HL60	44
6. Espressione Genica delle Forme Trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b nei Pazienti affetti da MDS ad Alto Rischio	44
7. Espressione Genica delle Forme Trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b nei Pazienti affetti da MDS ad Alto Rischio in seguito a Trattamento con 5'-Azacitidina	48
8. Studio della Specificità degli Anticorpi della via di Trasduzione del Segnale Akt/mTOR mediante Analisi Immunocitochimica e Western Blotting su Linee Cellulari	50
9. Studio dell'Espressione proteica della PI-PLC β 1 nelle MDS mediante Analisi Immunocitochimica	53
10. Studio dell'Espressione Proteica di Akt nelle MDS mediante Analisi Immunocitochimica	54
11. Studio del Fenotipo di Akt nelle MDS mediante Analisi al Citofluorimetro in un Paziente affetto da MDS in seguito a Trattamento con 5'-Azacitidina	57
12. Studio dell'Espressione Proteica di Akt e PI-PLC β 1, mediante Analisi Immunocitochimica, in un Paziente affetto da MDS in seguito a Trattamento con 5'-Azacitidina	58
13. Studio dell'Espressione Proteica di alcuni bersagli Molecolari a valle di Akt mediante Analisi Immunocitochimica: asse di Attivazione mTOR / 4E-BP1/ p70S6K nelle MDS	60
14. Analisi dell'Espressione di Akt e mTOR ni Lineare Differenziativi Mieloide ed Eritroide	62
15. La Rapamicina induce Apoptosi nelle Cellule CD33 ⁺ nelle MDS ad alto Rischio	63
16. Saggio Clonogenico su Cellule CD34 ⁺ derianti da Donatori Sani e Pazienti affetti da MDS	65
Discussione	67
Bibliografia	73
Pubblicazioni su Riviste Internazionali con Collegio di Revisori	79

INTRODUZIONE

1. SINDROMI MIELODISPLASTICHE (MDS)

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

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

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

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

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

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

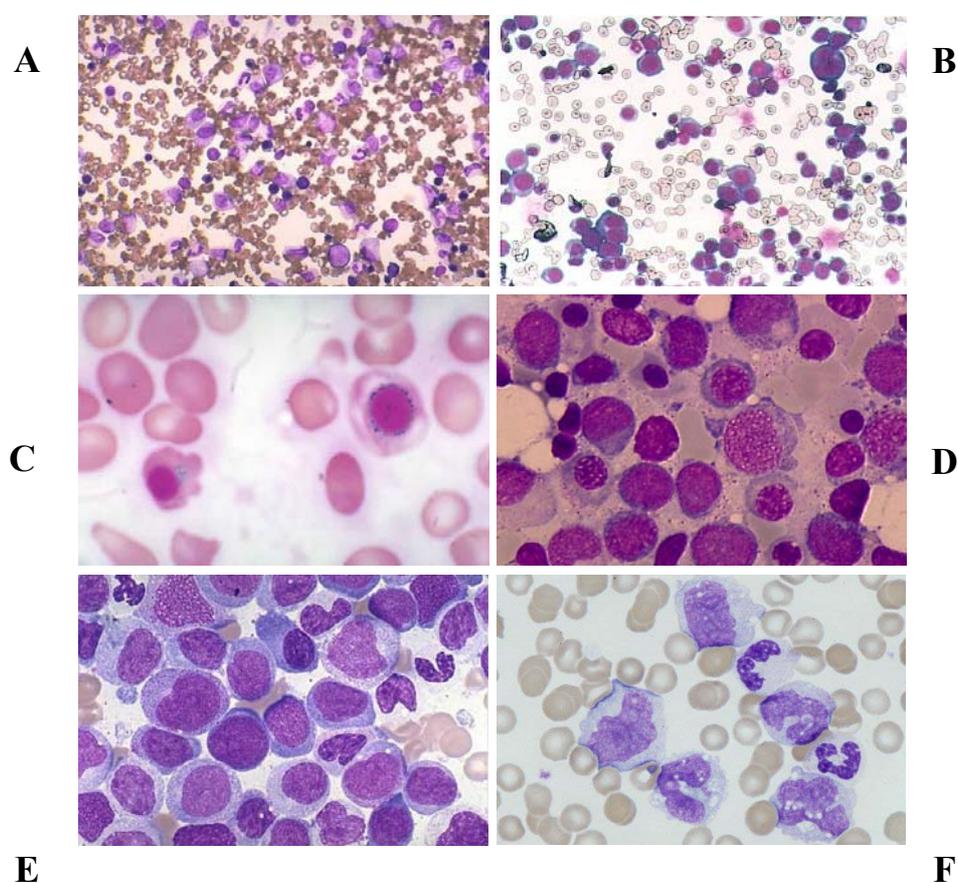


Figura 1. Morfologia dei blasti nelle MDS. (A) Midollo osseo normale. **(B)** Anemia refrattaria o RA. **(C)** Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello o RARS. **(D)** Anemia refrattaria con eccesso di blasti o RAEB. **(E)** Anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione o RAEB-T. **(F)**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

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

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

Tabella 2. Classificazione WHO delle MDS

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

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

Tabella 3. Classificazione IPSS delle MDS

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

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

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

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

1.1. TRATTAMENTO DELLE MDS: 5'-AZACITIDINA

Diverse strategie vengono utilizzate per il trattamento dei pazienti con MDS; i principali obiettivi terapeutici sono il miglioramento dell'emopoiesi e della qualità di vita del paziente. Terapie di supporto sono indirizzate a pazienti affetti da MDS a basso rischio (IPSS *Low*, *Intermediate-1*), mentre pazienti affetti da MDS ad alto rischio (IPSS *Intermediate-2*, *High*) necessitano di terapie più aggressive (chemioterapia aggressiva e/o trapianto di cellule staminali). Tuttavia, a causa dell'elevata età media dei pazienti con MDS, solo un terzo di questi possono essere sottoposti a trattamenti citotossici intensivi.

Il fenomeno della metilazione è stato osservato in numerose forme di cancro e potrebbe rappresentare un marcatore molecolare con un importante significato prognostico.

La 5'-azacitidina e la decitabina sono due inibitori delle DNA metiltransferasi (DNMT) che sono attualmente utilizzati nel trattamento delle MDS, oltre ad essere impiegati in protocolli sperimentali per la terapia di altre neoplasie ematologiche. Alcuni studi hanno riportato che l'utilizzo di questi farmaci ha portato il 50-80% dei casi affetti da MDS ad avere una buona risposta clinica: i pazienti trattati mostravano una minor progressione in LMA e un miglioramento sia della qualità della vita che della sopravvivenza. Si pensa che trattamenti a basso regime con questi agenti demetilanti potrebbero riattivare geni coinvolti nella crescita cellulare che sono stati silenziati

attraverso un meccanismo di metilazione. Ad esempio, in alcuni pazienti affetti da MDS trattati con decitabina è stata osservata la demetilazione del gene p15/INK4B. Tuttavia, il meccanismo molecolare di tali farmaci non è ancora stato chiarito, per cui è necessario cercare altri possibili target terapeutici.

Come mostrato in Figura 2, il meccanismo d'azione della 5'-azacitidina e di altri analoghi pirimidinici della citosina si basa sulla formazione di complessi con le DNA metiltrasferasi, portando all'inattivazione di tali enzimi. Inoltre, la 5'-azacitidina può essere incorporata anche nell'RNA e dare origine a RNA messaggeri e transfer difettivi, inibendo quindi la sintesi proteica.

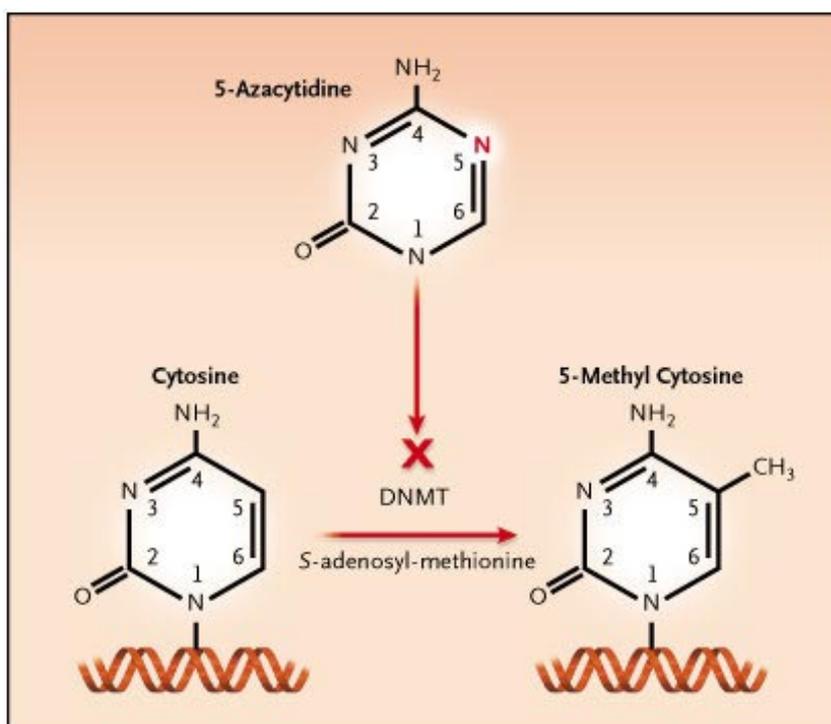


Figura 2. Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione della 5'-azacitidina. Il farmaco agisce bloccando le DNA metil-transferasi che non riescono più a convertire la citosina in metil-citosina.

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

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

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

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

recente l'espressione dei geni in cellule di eritroleucemia murina di Friend in cui era stata indotta la sovra-espressione della PI-PLC β 1 (Fiume R et al, 2005). In particolare, in questo sistema, è stato evidenziato che uno dei bersagli molecolari della PI-PLC β 1 è la molecola CD24, di cui già si riconosce un ruolo nella biologia dei tumori (Kristiansen G et al, 2004).

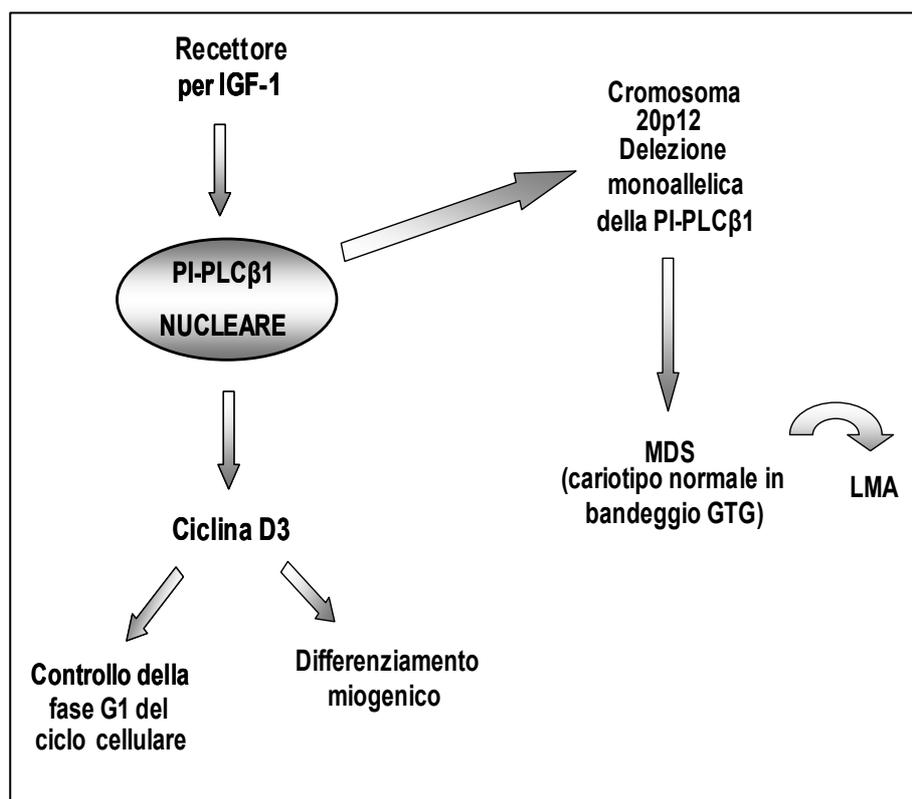


Figura 3. La PI-PLC β 1 nucleare regola il differenziamento miogenico e la normale crescita cellulare agendo in entrambi i casi sulla ciclina D3 e regolando la progressione del ciclo cellulare in fase G1. La delezione mono-allelica del suo gene potrebbe risultare responsabile della progressione delle MDS in LMA, essendo coinvolto nello sbilanciamento del ciclo cellulare.

2.1. STRUTTURA DEL GENE DELLA PI-PLC β 1

Negli ultimi anni, diversi studi si sono concentrati sulla caratterizzazione molecolare del gene per la PI-PLC β 1 (Follo MY et al, 2005). Mediante la tecnica FISH, il gene che codifica per la PI-PLC β 1 è stato mappato sul braccio corto del cromosoma 20, nel locus 20p12.3, in un intervallo di 1.9 cM delimitato dai marcatori D20S917 a 25 cM e D20S177 a 26.9 cM. Il gene dista meno di 1Mb dal gene che codifica per la PI-PLC β 4 (locus 20p12.3), un'altra fosfolipasi umana la cui

regolazione è totalmente indipendente da quella della PI-PLC β 1. Il gene della PI-PLC β 1 copre una regione sul genoma di 250 kbp ed è formato da 36 piccoli esoni e 35 introni molto grandi (Peruzzi D et al, 2000). Dallo stesso gene si producono due isozimi, denominati *a* e *b*, che si formano per la presenza di un sito di *splicing* alternativo presente nella regione 5'-UTR oppure nella regione 3'-UTR (Peruzzi D et al, 2002). Come mostrato in Figura 4, se il sito di *splicing* si trova nella regione 5'-UTR, nell'isozima *b* è presente un esone aggiuntivo contenente un codone di stop che induce la formazione di una proteina troncata che ha un peso molecolare di circa 140 kDa, mentre l'isozima *a* dà origine ad una proteina di circa 150 kDa. Invece, se il sito di *splicing* alternativo è presente nella regione 3'-UTR, si ha la formazione di una diversa regione 3'-UTR che dà origine ad un altro isozima *b*, che produce anch'esso una proteina più corta. Oltre al peso molecolare, le due proteine differiscono anche per la diversa localizzazione cellulare, in quanto la PI-PLC β 1b si trova prevalentemente nel nucleo, mentre la PI-PLC β 1a è uniformemente distribuita tra nucleo e citoplasma (Bahk YY et al, 1998).

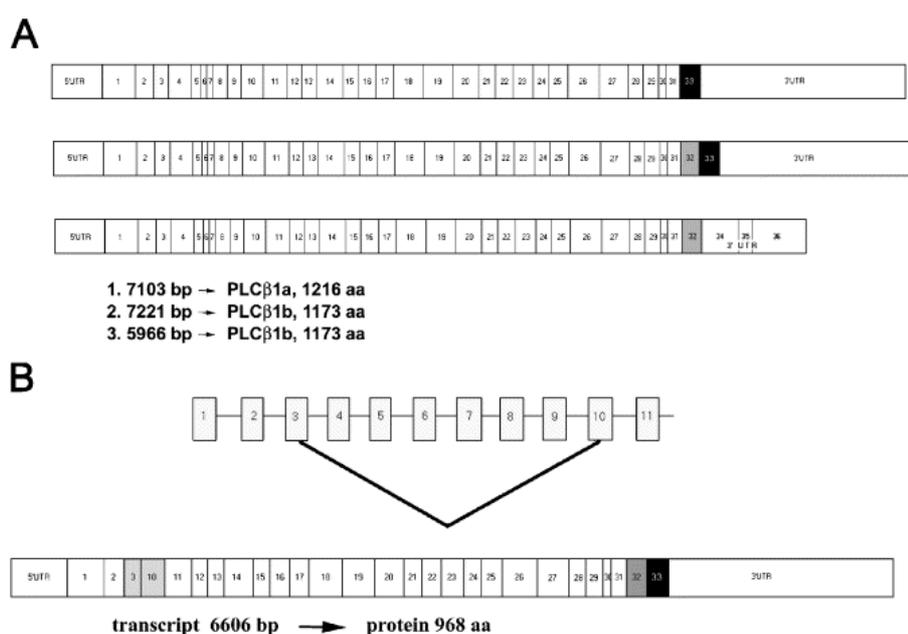


Figura 4. (A) Struttura del cDNA della PI-PLC β 1a e della PI-PLC β 1b. In alto è rappresentato il cDNA della PI-PLC β 1a, in mezzo il cDNA della PI-PLC β 1b ed in basso il cDNA della PI-PLC β 1b derivante dallo *splicing* alternativo che coinvolge un diverso 3'UTR. **(B)** Struttura della variante che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

2.2. STRUTTURA PROTEICA DELLA PI-PLC β 1

La PI-PLC β 1 si trova nella cellula sotto forma di due isozimi (PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b) che agiscono come effettori a valle di recettori di membrana associati a proteine G (GPCR). Le sequenze proteiche di entrambi gli isozimi presentano alcune strutture fondamentali (Follo MY et

al, 2005). E' costituita infatti da due domini altamente conservati (X e Y), che formano il sito catalitico dell'enzima, intorno ai quali si organizzano altre regioni funzionali, rappresentati da domini PH, domini a mano EF e un singolo dominio a motivo C2 (Figura 5). Inoltre, sono presenti alcune sequenze funzionalmente molto importanti, rappresentate dal segnale di localizzazione nucleare (NLS), di attivazione dell'enzima a livello nucleare e di terminazione dell'attivazione (Rhee SG, 2001). Come evidenziato in precedenza, le due proteine differiscono per la localizzazione cellulare, in quanto la PI-PLC β 1b si trova prevalentemente nel nucleo, mentre la PI-PLC β 1a è uniformemente distribuita tra nucleo e citoplasma. Inoltre, è importante sottolineare il fatto che in questi due compartimenti cellulari i meccanismi di attivazione della PI-PLC β 1 risultano essere totalmente indipendenti. A livello citoplasmatico la PI-PLC β 1 viene attivata grazie all'interazione con la subunità $G\alpha_q$ attivata delle proteine G (Lee CH et al, 1992). Infatti, tale subunità interagisce con il dominio C2 e i residui della regione C-terminale (Park D et al, 1993) della PI-PLC β 1 ancorata a livello della membrana plasmatica in seguito all'interazione del suo dominio PH con il fosfatidil-inositolo-3,4,5 trisfosfato (PIP $_3$) (Razzini G et al, 2000). A livello nucleare, invece, l'attivazione della PI-PLC β 1 sembra riconducibile alla fosforilazione di una sequenza consenso (P-S-S-P), situata a livello dei residui amminoacidici 980-983, in corrispondenza della regione C-terminale. Tale sequenza viene di solito fosforilata da una chinasi (MAPK) il cui substrato naturale è rappresentato da proteine che inducono la mitosi cellulare. Infatti, in fibroblasti di topo Swiss 3T3 trattati con IGF-1, che provoca la traslocazione nucleare della p42/44 MAPK attivata, si osserva un'iper-fosforilazione del residuo Ser982 della PI-PLC β 1 nucleare (Martelli AM et al, 2000). La sostituzione di questo residuo con un residuo di Gly blocca l'attivazione della fosfolipasi, fornendo così una possibile prova a favore di questo meccanismo d'attivazione (Xu A et al, 2001).

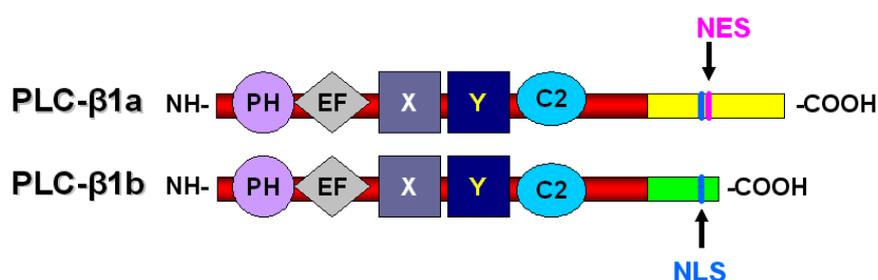


Figura 5. Domini funzionali delle proteine codificate dal gene della PI-PLC β 1.

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

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

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

Nelle cellule di mammifero esistono 3 diverse classi di chinasi lipidiche PI3K, ognuna delle quali presenta caratteristiche diverse in termini di struttura molecolare e specificità di substrato (Figura 6).

La classe I è quella maggiormente studiata, in quanto è collegata a stimoli extracellulari, come i fattori di crescita e le citochine (Martelli AM et al, 2005). Infatti, in seguito al legame, a livello dei recettori di membrana, di diversi fattori di crescita e citochine, la PI3K localizzata a livello della membrana fosforila il PIP₂ trasformandolo in PIP₃, che a sua volta attiva numerosi substrati a valle (Figura 7). La classe I è ulteriormente suddivisa in due sottoclassi:

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

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

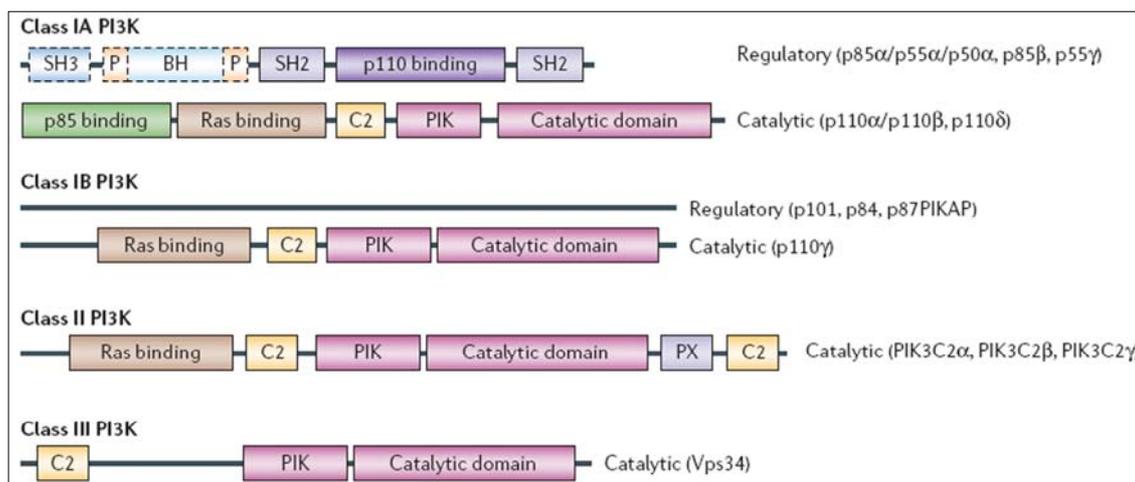


Figura 6. Classificazione della fosfoinositide 3 chinasi (PI3K). Esse si distinguono in 3 classi, ognuna delle quali mostra una diversa specificità per i substrati. Tutte le isoforme di PI3K sono ampiamente espresse in tutto l'organismo, ad eccezione della classe IA con subunità catalitica p110δ presente prevalentemente nei linfociti.

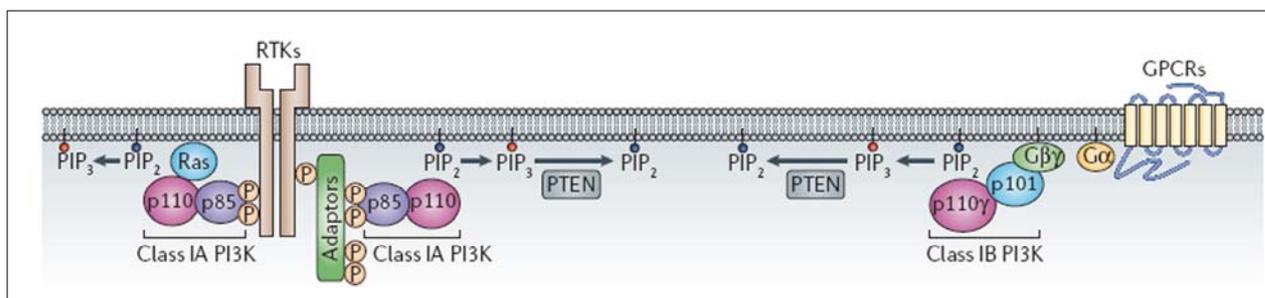


Figura 7. Meccanismo di attivazione della PI3K di classe I. L'attivazione della classe IA avviene mediante recettori per fattori di crescita tirosina-chinasi, mentre l'attivazione della classe IB avviene attraverso i recettori accoppiati a proteine G. PTEN defosforila il fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP₃) inibendo la segnalazione di PI3K. La fosfatasi SHIP converte il PIP₃ in fosfatidilinositolo-3,4-bisfosfato (PIP₂).

3.1. ISOFORME DI Akt

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

Esistono 3 isoforme di Akt: Akt1, che è espresso in modo ubiquitario ad alti livelli, con l'eccezione di rene, fegato e milza; Akt2, che ha un'espressione variabile nei diversi organi, con prevalenza a livello dei muscoli scheletrici, organi intestinali e tessuti riproduttivi; Akt3, che è altamente espresso nel cervello e nel testicolo (Figura 8).

Akt contiene un dominio PH (*pleckstrin homology*) capace di interagire con i prodotti lipidici fosforilati di PI3K (principalmente il PIP_3), sintetizzati a livello della membrana. Il reclutamento di Akt a livello della membrana plasmatica porta ad un cambiamento conformazionale che permette al loop di attivazione della chinasi di essere fosforilato sul residuo Thr308 da una protein-chinasi fosfoinositide dipendente (PDK1) e sulla Ser473 posta nel motivo idrofobico C-terminale da un'altra chinasi (PDK2).

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

Quindi, come mostrato in Figura 9, Akt si trova al centro di una complessa rete di processi cellulari che influenzano la proliferazione e il differenziamento cellulare, nonché la progressione lungo il ciclo cellulare e l'apoptosi.

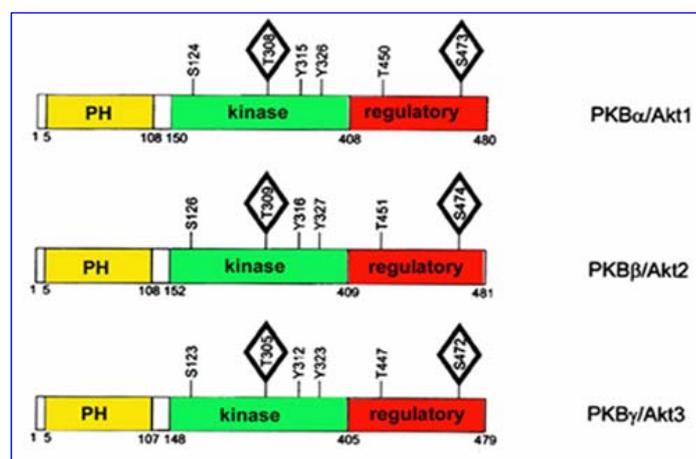


Figura 8. Isoforme di Akt o Proteina chinasi B (PKB).

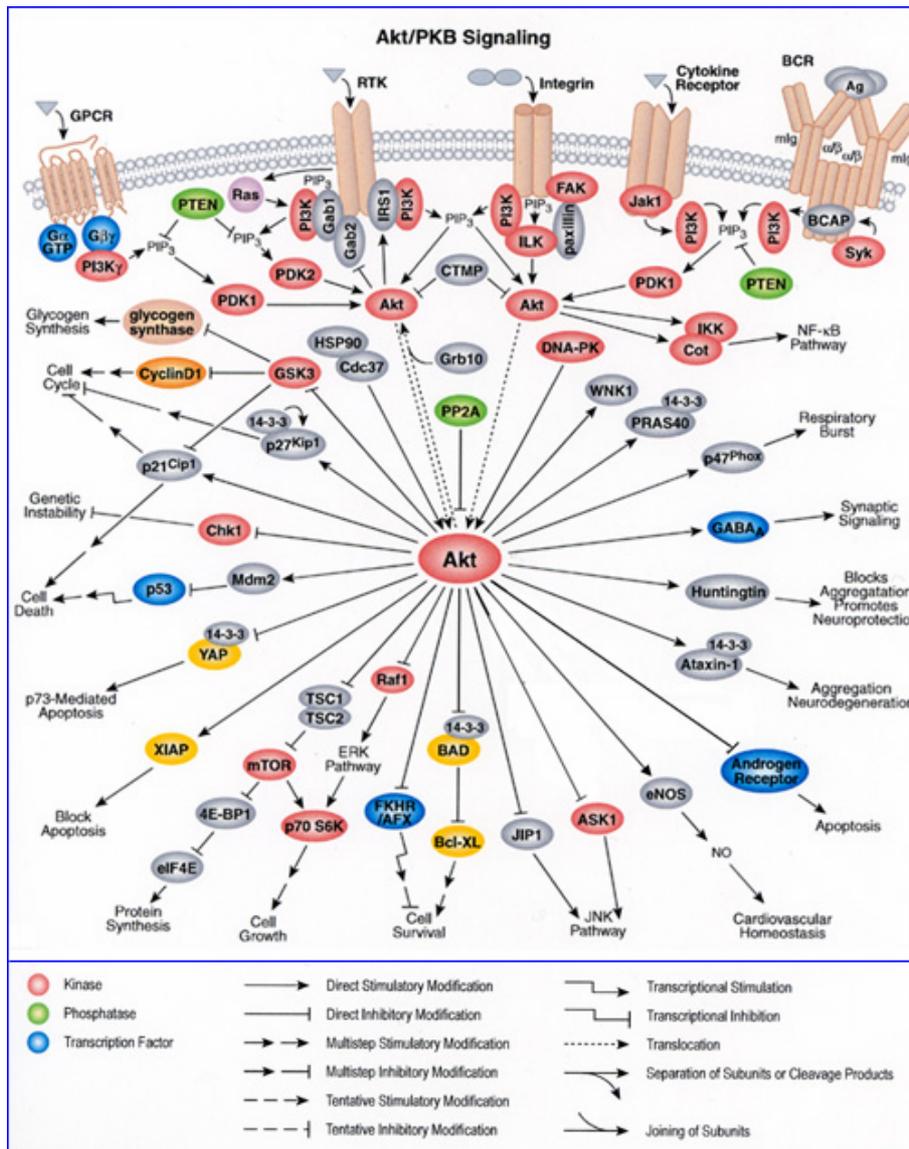


Figura 9. La via di segnalazione cellulare PI3K/Akt è coinvolta in numerosi processi fisiologici della cellula.

3.2. RUOLO DI Akt NEI DISORDINI EMATOPOIETICI

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

In circa il 15-20% dei pazienti affetti da AML, si è visto che N-RAS o K-RAS presentano mutazioni puntiformi, che abrogano l'attività GTPasica intrinseca di RAS con conseguente effetto stimolatorio sull'asse PI3K/Akt. Inoltre, nel 20-30% dei pazienti sono state rilevate mutazioni nella porzione extracellulare o intracellulare di *c-kit*, un altro recettore dotato di attività tirosin-chinasica che ha come ligando specifico lo *stem cell factor (scf)*; tali mutazioni attivanti di *c-kit* portano ad una up-regolazione dell'asse PI3K/Akt. Infine, circa il 75% dei pazienti affetti da AML mostra fosforilazione a carico di PTEN, che è significativamente associata alla fosforilazione di Akt e a ridotta sopravvivenza. E' noto che la fosforilazione di PTEN a livello del dominio regolatore C-terminale stabilizza la fosfatasi, ma la rende meno attiva verso il suo specifico substrato: PIP₃.

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

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

3.3. RUOLO DI Akt NEI MECCANISMI APOPTOTICI

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

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

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

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

3.4. RUOLO DI Akt NELLA PROGRESSIONE ATTRAVERSO IL CICLO CELLULARE

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

Nelle cellule HL60 è stata dimostrata una stretta correlazione tra la localizzazione citoplasmatica di p27^{Kip1}, un inibitore diretto di cdk2, e l'attivazione di Akt (Cappellini A et al, 2003). Infatti, Akt può fosforilare p27^{Kip1}, che a sua volta attiva alcuni fattori di trascrizione, tra cui E2F1, con un effetto diretto sulla replicazione del DNA e la proliferazione cellulare. Infatti, l'attivazione di p27^{Kip1} induce la traslocazione della proteina stessa al citoplasma, dove non può più esercitare il proprio effetto inibitorio e quindi c'è aumento della proliferazione cellulare (Martelli AM et al, 2006).

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

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

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

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

Come mostrato in Figura 10, anche la regolazione di mTOR mediante Akt è un processo complesso. Akt inibisce la funzione di TSC2 (*Tuberous Sclerosis 2 o Hamartin*) attraverso un meccanismo di fosforilazione diretta. TSC2 è una proteina GAP (GTP-ase Activating Protein) che agisce in associazione con la proteina TSC1 putativa (*Tuberin*) per inattivare le proteine G Rheb (*Ras Homolog Enriched in Brain*). La fosforilazione di TSC2 da parte di Akt reprime l'attività GAP del complesso TSC1/TSC2, permettendo l'accumulo di Rheb in uno stato legato a GTP. Il complesso Rheb-GTP può poi attivare, attraverso un meccanismo non ancora chiarito, l'attività chinasi di mTOR, che forma un complesso con Raptor (*Regulatory Associated Protein of mTOR*) e mLST8 (denominato anche GβL), una proteina omologa alla subunità β delle proteine G eterotrimeriche. Il complesso mTOR/Raptor/mLST8 (denominato anche mTORC1) è sensibile alla rapamicina e in alcuni casi inibisce Akt attraverso un feedback negativo che coinvolge, almeno in parte, p70S6K. Il rapporto che lega Akt e mTOR è ulteriormente complicato dall'esistenza di un complesso mTOR/Rictor (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*)/mLST8 (denominato anche mTORC2), che presenta un'attività non sensibile alla rapamicina (Martelli AM et al, 2006).

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

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

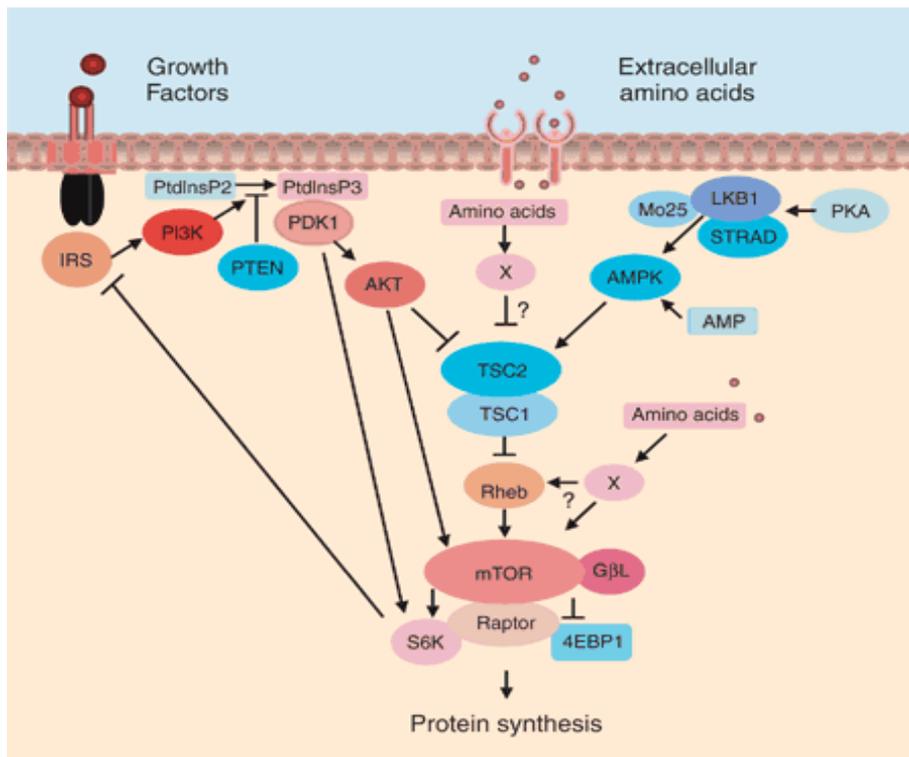


Figura 10. Asse di attivazione Akt/mTOR e bersagli molecolari a valle (4E-BP1 e p70S6K).

SCOPO DELLA RICERCA

Come già illustrato in precedenza, le MDS sono un gruppo eterogeneo di malattie del sangue che coinvolgono alterazioni a livello delle cellule staminali emopoietiche, che non sono più in grado di maturare e differenziare in modo adeguato. I meccanismi patogenetici che sottostanno a questa patologia non sono stati però del tutto chiariti, anche se farmaci demetilanti, quali la 5'-azacitidina sembrano essere efficaci.

Recentemente è stato evidenziato che alcuni pazienti affetti da MDS ad alto rischio e portatori di una delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1 mostrano un'evoluzione clinica peggiore rispetto ai pazienti con entrambi gli alleli (Lo Vasco VR et al, 2004). Altri studi hanno dimostrato che l'espressione della PI-PLC β 1 è down-regolata durante il differenziamento delle cellule di eritroleucemia murina di Friend (Martelli AM et al, 1994), rafforzando l'ipotesi che questo enzima possa giocare un ruolo importante nella generazione dei blasti dei pazienti affetti da MDS (Cocco L et al, 2005). Inoltre, è stato dimostrato che pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano attivazione dell'asse PI3K/Akt, indicando quindi uno sbilanciamento dei meccanismi apoptotici.

Muovendo da queste promesse, lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare le vie di segnalazione inositide-dipendente in pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio di evoluzione in LMA. L'analisi è stata condotta a diversi livelli.

Innanzitutto, sono state effettuate analisi citogenetiche per l'identificazione dello stato allelico della PI-PLC β 1 ed è stata studiata la sequenza della regione C-terminale del DNA genomico del suddetto gene nei casi di MDS che presentavano delezione mono-allelica.

Inoltre, è stata applicata una metodica di Real-Time PCR per l'analisi trascrizionale, in modo da quantificare i livelli di mRNA prima e durante il trattamento terapeutico con 5'-azacitidina.

Infine, è stata valutata l'espressione di proteine-chiave nel signalling lipidico intranucleare fosfoinositide-dipendente. Da un lato è stata valutata l'espressione della PI-PLC β 1, di p-Akt e PIP $_2$, in condizioni basali e durante il trattamento terapeutico. D'altro canto, poiché Akt può essere coinvolta in vie importanti per la proliferazione cellulare, è stato valutato il suo ruolo nell'attivazione dell'asse mTOR/4E-BP1/p70S6K. In particolare, l'approccio sperimentale usato in questa parte dello studio ha implicato l'uso di metodiche di immunocitochimica e citofluorimetria, per l'analisi dell'espressione proteica e del ciclo cellulare, oltre a studi sulla capacità clonogenica utili per valutare il differenziamento delle cellule staminali dei pazienti esaminati. Lo studio è stato condotto in condizioni basali e dopo trattamento con rapamicina, uno specifico inibitore di mTOR, che è servito per comprendere il ruolo di quest'asse di segnalazione nelle MDS.

MATERIALI e METODI

1. Colture cellulari *in vitro*

La linea cellulare promielocitica umana HL60 e le cellule T-linfoblastoidi umane CEM sono state coltivate in terreno RPMI-1640 con l'aggiunta di 10% FCS (*Fetal Calf Serum*) e penicillina/streptomicina ad una densità ottimale di $0.3-0.8 \times 10^6$ cells/mL.

2. Caratteristiche dei Pazienti

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

I pazienti sono stati inseriti in un protocollo che prevedeva un braccio di controllo ed uno con somministrazione di 5'-azacitidina ad intervalli di due settimane e valutazione delle condizioni ematologiche una volta al mese.

3. Separazione delle cellule mononucleate

I campioni di sangue midollare e periferico sono stati diluiti 1:3 con soluzione fisiologica sterile (0,9% p/v NaCl). Sotto cappa a flusso laminare è stato disposto un numero di provette sterili da 15 mL adeguato alla quantità di materiale da processare. In particolare, è stata considerata una provetta ogni 5 mL di sangue diluito. In ciascuna provetta da 15 mL sono stati dispensati 3 mL di Ficoll (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare). Successivamente, 5 mL di campione diluito sono stati introdotti nella provetta contenente il Ficoll, evitando che il campione si mescolasse al Ficoll stesso. Il campione è poi stato centrifugato a 1900 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente e senza freno. Al termine della centrifuga, all'interno della provetta, procedendo dal basso verso l'alto, si distinguono diverse fasi: globuli rossi, Ficoll, cellule mononucleate disposte ad anello e plasma (Figura 11).

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

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

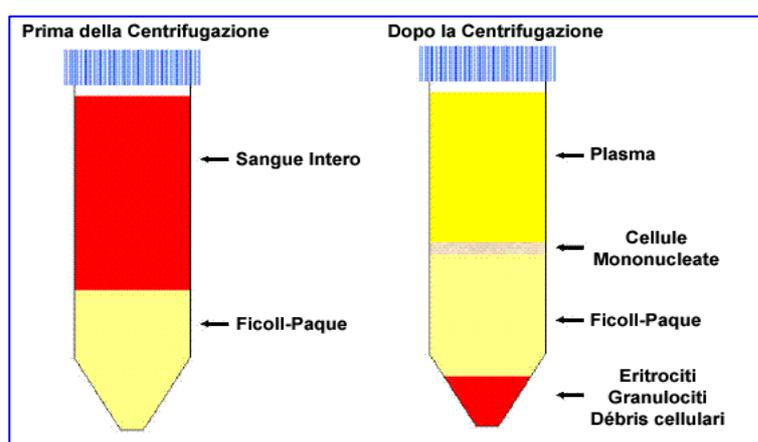


Figura 11. Separazione su gradiente di densità Ficoll-Paque.

4. Ibridazione Fluorescente in situ (FISH)

Le analisi citogenetiche sono state condotte su campioni di cellule mononucleate provenienti da sangue midollare; in particolare l'analisi è stata effettuata sia su nuclei in interfase che in metafase. Le cellule sono state infatti stimolate con fitoemoagglutinina (PHA) per 72h, in seguito alle quali è stata usata la colchicina per disgregare i microtubuli del fuso mitotico ed ottenere cellule in metafase. L'analisi FISH è stata effettuata usando diverse sonde (Lo Vasco VR et al, 2004). La prima sonda usata è specifica per il gene della PI-PLC β 1 (PAC Clone HS881E24 della *library* RPCI-5PAC), oltre ad essa è stata usata una sonda per la regione subtelomerica del braccio corto del cromosoma 20 (Cytocell/Celbio, Milan, Italy) ed una per il gene della PI-PLC β 4 (cDNA gentilmente fornito dal Dr. Sue Goo Rhee, NIH, Bethesda, MD, USA). Le analisi FISH per i geni

della PI-PLC β 1 e PI-PLC β 4 sono state effettuate secondo i metodi standard: il DNA è stato marcato con nucleotidi biotinilati attraverso un metodo di *nick translation* e le sonde sono state rivelate attraverso una miscela contenente streptavidina coniugata con Cy3 (Sigma-Aldrich, Italy). L'analisi per la regione subtelomerica del cromosoma 20 è stata eseguita secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Le immagini sono state acquisite usando un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 800 e analizzate mediante il software Genikon.

5. Estrazione del DNA ed analisi mutazionale

Il DNA genomico è stato isolato dalle cellule mononucleate estratte da pazienti affetti da MDS e da donatori sani usando il kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Ltd, Valencia, CA, USA) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Sui campioni di DNA è stata poi effettuata un'analisi di sequenza in modo da accertare l'eventuale presenza di mutazioni a carico della regione C-terminale del gene della PI-PLC β 1, e in particolare l'esone 29, attraverso l'uso di due primer specifici (Forward: 5'-GAAGGAAGCTCTGTTTGCAATCAT-3'; Reverse: 5'-AATAATTCCCAGATGAACTGTTTGG-3'). Inoltre, è stata effettuata anche un'analisi degli esoni 9 e 20 del gene della subunità p110 α della PI3K (Malaponte G et al, 2006).

6. Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

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

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

7. Real-Time PCR

L'espressione genica delle due forme trascrizionali del gene della PI-PLC β 1 è stata quantificata attraverso un metodo di Real-Time PCR e l'uso di sonde TaqMan specifiche per le due forme trascrizionali della PI-PLC β 1 (Assay n°Hs01001939_m1 e Hs01008373_m1, Applied Biosystems).

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

L'amplificazione è stata condotta caricando ogni campione su una piastra da 96 pozzetti (MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems) con volume totale di reazione di 25 μ L. La corsa di Real-Time PCR è stata effettuata su uno strumento ABI Prism 1300 SDS (Applied Biosystems) impostando le seguenti condizioni di amplificazione: 50°C 2 minuti, 95°C 10 minuti seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

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

8. Analisi Immunocitochimica

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

In breve, dopo essere state risospese in terreno RPMI-1640 (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) ad una concentrazione di 0.3×10^6 cell/mL, le cellule sono state poste su vetrini carichi elettrostaticamente utilizzando lo strumento Shandon Cytospin (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA) con un'accelerazione lenta per 5 minuti a 200 rpm/min. I vetrini sono stati fissati con formaldeide al 4% (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) in un tampone PBS (phosphate-buffered saline 1x, pH 7.4) per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS1x da 5 minuti ciascuno, le cellule sono state permeabilizzate con 0.2% Triton X-100 in PBS1x per 10 minuti a temperatura ambiente. In seguito, i vetrini sono stati lavati in PBS1x e sottoposti ad una saturazione di 60 minuti con una miscela contenente il 5% di albumina sierica bovina (BSA) in PBS1x a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state incubate *overnight* a +4°C in

una camera umida con i corrispettivi anticorpi primari diluiti in una soluzione all'1% di BSA in PBS1x. Il giorno successivo, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi da 5min ciascuno con una soluzione contenente 0.1% Tween-20 in PBS1x e incubate in una camera umida con i corrispettivi anticorpi secondari coniugati con Cy3 (diluiti 1:5000) o con FITC (diluiti 1:200) al buio per 45 minuti a temperatura ambiente. Per verificare la specificità degli anticorpi utilizzati sono state anche effettuate incubazioni con il solo anticorpo secondario. Come colorante di contrasto per i nuclei è stata utilizzata una soluzione contenente DAPI/Antifade (Resnova, Rome, Italy).

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

Tabella 4. Anticorpi primari e secondari

Anticorpi Primari		
	<i>Source</i>	<i>Company</i>
PI-PLC β 1	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
PIP ₂	Rabbit	Echelon Biosciences
Akt	Rabbit	Cell Signalling
p-Akt	Rabbit	Cell Signalling
p-Akt 488 Alexa Fluor	Rabbit	Cell Signalling
mTOR	Rabbit	Cell Signalling
p-mTOR	Rabbit	Cell Signalling
4EBP1	Rabbit	Cell Signalling
p-4EBP1	Rabbit	Cell Signalling
p70S6K	Mouse	Cell Signalling
p-p70S6K	Mouse	Cell Signalling
Erk1/2	Rabbit	Cell Signalling
p-Erk1/2	Rabbit	Cell Signalling

Anticorpi Secondari		
	<i>Source</i>	<i>Company</i>
Anti-Mouse FITC	Sheep	Sigma-Aldrich
Anti-Rabbit FITC	Sheep	Sigma-Aldrich
Anti-CD33-PE	Mouse	Miltenyi-Biotech
Anti-CD71-PE	Mouse	Miltenyi-Biotech

9. Separazione delle cellule CD33⁺

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

In breve, le cellule sono state centrifugate a 800 rpm, ed è poi stato eliminato il surnatante. Il *pellet* è poi stato risospeso in 80 µL di tampone di eluizione (PBS pH 7.2, 0,5% BSA e 2mM EDTA) e sono stati aggiunti 20 µL di biglie immunomagnetiche (MACS microbeads Miltenyi Biotec Germany) ogni 10⁷ cellule; il tutto è stato mescolato ed incubato 15 minuti a +4 °C. Le cellule sono poi state lavate in 1 mL di PBS1x ogni 10⁷ cellule e centrifugate a 800 rpm per 10 minuti; è stato poi eliminato il surnatante e il *pellet* è stato risospeso in 500 µL di PBS1x. Come mostrato in Figura 12, la colonna di eluizione MS è stata posta nell'appropriato supporto ed il supporto nel campo magnetico. In seguito, sono stati aggiunti 500 µL di PBS1x per equilibrare la colonna. La sospensione cellulare è stata posta nella colonna, che ha trattenuto le cellule marcate e ha invece eluito quelle non marcate. La colonna è poi stata lavata 3 volte con il tampone di eluizione e la frazione di cellule non marcate è stata raccolta. La colonna è stata poi rimossa dal separatore magnetico e messa in un tubo pulito. Infine, è stato aggiunto 1 mL di tampone di eluizione e, applicando l'apposito stantuffo fornito dal kit, è stata immediatamente eluita la frazione marcata contenente cellule CD33⁺.

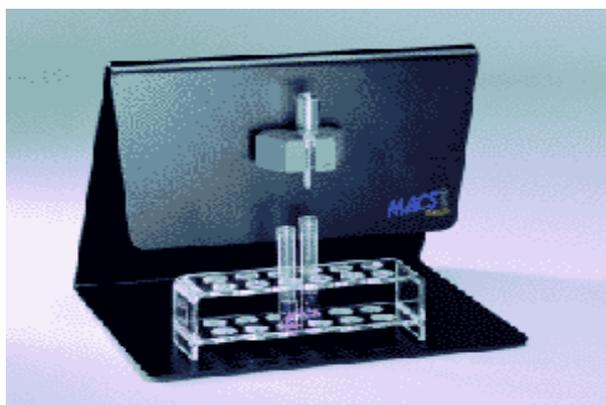


Figura 12. MiniMACS per la separazione delle cellule CD33⁺ e CD34⁺

10. Analisi Citofluorimetrica per la quantificazione dell'apoptosi

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

Al termine dei tempi di trattamento, le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1000 rpm per 10 minuti. Il *pellet* è stato risospeso in 1 mL di PBS1x freddo ed è stato nuovamente centrifugato a 1000 rpm per 10 minuti. Successivamente, il *pellet*

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

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

11. Analisi Citofluorimetrica per l'analisi del fenotipo

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

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

Per tarare lo strumento ed eliminare la fluorescenza di fondo, i campioni contenenti le cellule sono stati preparati in doppio; in un campione è stato aggiunto l'anticorpo per p-Akt (Rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugate) ad una concentrazione pari a 50 ng/µL, mentre nell'altro campione è stato aggiunto un anticorpo irrilevante (Upstate #30491 Normal Rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugate negative control) ad una concentrazione pari a 5 ng/µL. In seguito, entrambi i campioni

sono stati incubati *overnight* a +4 °C. Il giorno successivo, le cellule sono state sottoposte ad un lavaggio con 1 mL di PBS1x freddo e centrifugati a 800rpm per 5 minuti a +4°C, vortexati e poi risospesi in 400 µL di PBS1x freddo e analizzati al citofluorimetro.

12. Separazione delle cellule CD34⁺

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

In breve, le cellule sono state centrifugate a 800 rpm ed è poi stato eliminato il surnatante. Il *pellet* è poi stato risospeso in 300 µL di tampone di eluizione (PBS pH 7.2, 0,5% BSA e 2mM EDTA); in seguito sono stati aggiunti 100 µL di FcR Blocking Reagent e 100µL di biglie immunomagnetiche (MACS microbeads Miltenyi Biotec Germany) ogni 10⁸ cellule; il tutto è stato poi mescolato ed incubato 30 minuti a +4 °C. Successivamente le cellule sono state lavate in 1 mL di PBS1x ogni 10⁷ cellule e centrifugate a 800 rpm per 10 minuti; è stato poi eliminato il surnatante e il *pellet* è stato risospeso in 500 µL di PBS1x. Come mostrato in Figura 12, la colonna di eluizione MS è stata posta nell'appropriato supporto nel campo magnetico. Successivamente, sono stati aggiunti 500 µL di PBS1x per equilibrare la colonna. La sospensione cellulare è stata posta nella colonna, che ha trattenuto le cellule marcate e ha invece eluito quelle non marcate. La colonna è poi stata lavata 3 volte con il tampone di eluizione e la frazione di cellule non marcate è stata raccolta. La colonna è stata poi rimossa dal separatore magnetico e inserita in un tubo pulito. E' stato aggiunto 1 mL di tampone di eluizione e, applicando l'apposito stantuffo fornito dal kit, è stata immediatamente eluita la frazione marcata contenente cellule CD34⁺.

13. Saggio Clonogenico

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

Le cellule CD34⁺ estratte da campioni di midollo osseo di pazienti affetti da MDS e da donatori sani sono state risospese ad una concentrazione di 8x10³ cell/mL in terreno IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) addizionato con 2% FCS. La miscela contenente le cellule è poi stata aggiunta ad un terreno completo composto da metilcellulosa (MethoCult GF+ H4535, Stem Cell technologies), contenente diversi fattori di crescita emopoietici. Le cellule sono state

piastrate in dish da 35mm in presenza di rapamicina o LY294002; successivamente i dish sono stati messi all'interno di un incubatore in atmosfera umidificata (5% CO₂, 37°C).

Dopo 14 giorni circa, le colonie (>50 cellule) e i cluster (<50 cellule) cresciuti, come quelli mostrati in Figura 13, sono stati osservati al microscopio ottico invertito e valutati morfologicamente secondo il metodo descritto da Nissen-Druey (Nissen-Druey C et al, 2005), mentre l'analisi statistica è stata effettuata usando il software GraphPad Prism (v. 3.0).



Figura 13. Colonie cresciute in Metilcellulosa. Le colonie rosse sono eritrocitarie, mentre le colonie bianche sono monocitarie/granulocitiche.

14. Preparazione del lisato proteico totale

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 0.3×10^6 cellule/mL e lasciate crescere *overnight* a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state raccolte e centrifugate per 10 minuti a 1000rpm a temperatura ambiente, successivamente lavate in PBS1x e nuovamente centrifugate per 10 minuti a 1000rpm a temperatura ambiente. In seguito, dopo aver eliminato il surnatante, al *pellet* è stato aggiunto acido okadaico (20nM, Sigma Aldrich Corporation), DNAasi I (70 U/ml, Roche Diagnostics GmbH, Germany) ed il tampone di lisi composto da Tris-HCl 10mM pH 7.4 (Sigma-Aldrich Corporation); MgCl₂ 1mM (Merck, Darmstadt, Germany); EGTA 1mM (Sigma-Aldrich Corporation); Triton X-100 1% (Schwartz/Mann Biotech, Ohio, USA); saccarosio 0,25M (Sigma-Aldrich Corporation) e acqua bidistillata. Al tampone di lisi sono stati inoltre aggiunti: Na₃Vo₄ 1mM (Sigma-Aldrich Corporation); NaF 50mM (Sigma-Aldrich Corporation); β-glicerolfosfato 1mM (Sigma-Aldrich Corporation); Na pirofosfato 25mM (Sigma-Aldrich Corporation). Il *pellet* è stato quindi risospeso ed i campioni sono stati incubati in ghiaccio per 15 minuti; successivamente

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

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

15. Western Blotting

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

Come mostrato in Figura 14, ogni gel è costituito da due componenti. Il primo è il *Running Gel*, che si trova nella parte sottostante ed è preparato con H₂O, acrilammide/bis-acrilammide (Sigma-Aldrich), Tris-HCl pH 8.8, SDS 10% (Fluka BioChemika, Svizzera). Inoltre, vengono aggiunti due catalizzatori della polimerizzazione: ammonio persolfato (APS; Sigma-Aldrich) e TEMED (Amersham Biosciences UK Limited, Bucks, UK). Il secondo componente, definito *Stacking Gel*, si trova nella parte superiore ed è su questo gel che vengono caricati i campioni. In particolare, lo *Stacking Gel* è preparato con H₂O, acrilammide/bis-acrilammide, Tris-HCl pH 6.8, SDS 10 %, APS e TEMED.

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

L'omogenato è stato separato in SDS-PAGE (gel alla percentuale di 10-15% di acrilammide) a 300V e 32mAmp, mantenendo costante il voltaggio ed utilizzando un tampone per la corsa elettroforetica a pH 8.3 composto da SDS al 10%, Tris (Sigma-Aldrich) e glicina (Sigma-Aldrich). Nel momento in cui il fronte di corsa ha raggiunto il limite inferiore del gel, è stata

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

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

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

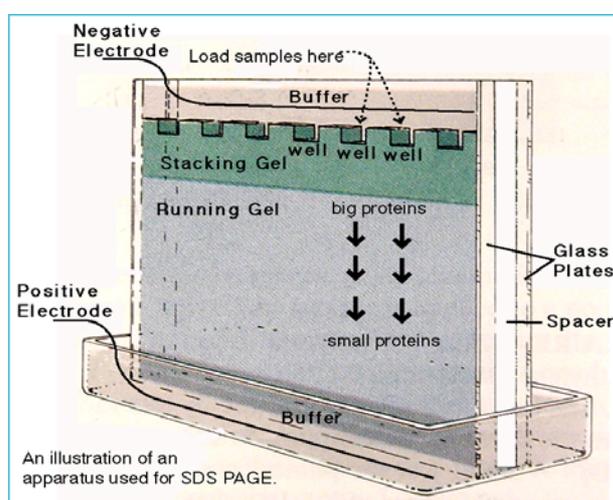


Figura 14. Rappresentazione schematica della struttura di un gel per la separazione SDS-PAGE.

RISULTATI

1. Caratteristiche dei pazienti

In questo studio sono state utilizzate cellule mononucleate estratte da campioni di sangue periferico e midollare di 45 pazienti affetti da MDS. In particolare, le caratteristiche di ogni paziente sono riassunte nelle Tabelle 5, 6 e 7. L'età media era 66.5 (range, 25-78 anni). I pazienti sono stati classificati secondo il fattore IPSS, considerando a basso rischio (n=15) coloro che rientravano nelle categorie Low o Intermediate-1 e ad alto rischio Intermediate-2 o High (n=30).

2. Analisi FISH

Tutti i pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio sono stati sottoposti ad analisi FISH per verificare lo stato allelico del gene della PI-PLC β 1, della PI-PLC β 4 e della regione subtelomerica del braccio corto del cromosoma 20 (Tel20p). L'analisi è stata eseguita su cellule in metafase e su nuclei in interfase, secondo il protocollo descritto da Lo Vasco VR et al, avendo una buona affidabilità da entrambi i metodi.

I risultati ottenuti da tale analisi sono riassunti nelle Tabelle 5, 6 e 7. Come si può osservare, 5/15 (circa il 33%) dei pazienti affetti da MDS ad alto rischio con cariotipo normale (Tabella 7) presentano una delezione mono-allelica della PI-PLC β 1, mentre risultano normali sia il gene per la PI-PLC β 4, localizzato a meno di 1Mb di distanza dal gene della PI-PLC β 1 nella regione più centromerica, che quello per la regione subtelomerica del cromosoma 20 (Tel20p), che si trova vicino al locus della PI-PLC β 1 (Figura 15). Per quanto riguarda i pazienti affetti da MDS a cariotipo alterato, circa il 53% di essi mostra delezione monoallelica della PI-PLC β 1, e anche in questo caso si tratta di una delezione interstiziale e specifica (Tabella 6). Complessivamente, la delezione coinvolge 13/30 pazienti (circa il 43%) affetti da MDS ad alto rischio, mentre nessun caso a basso rischio mostra tale alterazione genetica (Tabella 5).

Tali risultati indicano che l'assenza di uno dei due alleli della PI-PLC β 1 è dovuta ad una delezione interstiziale e specifica che non interessa né il gene della PI-PLC β 4, né la regione subtelomerica (Figura 16).

Tabella 5. Pazienti affetti da MDS a basso rischio

	Età	Diagnosi F.A.B.	Cariotipo	PI-PLCb1	PI-PLCb4	Tel 20p	Sopravvivenza (mesi)	Evoluzione
A	72	Low-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	20	Malattia Stabile
B	86	Low-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	22	Malattia Stabile
C	77	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	20	Malattia Stabile
D	76	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	12	Malattia Stabile
E	78	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	12	Malattia Stabile
F	77	Low-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	15	Malattia Stabile
G	77	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	12	Malattia Stabile
H	25	Low-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	20	Malattia Stabile
I	65	Low-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	24	Malattia Stabile
J	51	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	30	Malattia Stabile
K	63	Low-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	20	Malattia Stabile
L	75	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	24	Malattia Stabile
M	78	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	12	Malattia Stabile
N	66	Low-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	12	Malattia Stabile
O	70	Low-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	20	Malattia Stabile

Tabella 6. Pazienti affetti da MDS ad alto rischio con cariotipo alterato

	Età	Diagnosi F.A.B.	Cariotipo	PI-PLCb1	PI-PLCb4	Tel 20p	Sopravvivenza (mesi)	Evoluzione
A	†65	High-Risk MDS	+8	+/-	+/+	+/+	† 4 → AML	LMA- Deceduto
B	73	High-Risk MDS	A	+/+	+/+	+/+	3	Responsivo
C	72	High-Risk MDS	46,XX t(+8)	+/-	+/+	+/+	7 → AML	LMA
D	63	High-Risk MDS	A	+/+	+/+	+/+	17	Malattia Stabile
E	72	High-Risk MDS	A	+/-	+/+	+/+	4 → AML	LMA
F	†78	High-Risk MDS	A	+/+	+/+	+/+	†13	Deceduto - Malattia Stabile
G	73	High-Risk MDS	A	+/+	+/+	+/+	7	Malattia Stabile
H	79	High-Risk MDS	46,XY (-7)	+/+	+/+	+/+	† 22	Deceduto- Malattia Stabile
I	73	High-Risk MDS	A	+/-	+/+	+/+	2 → AML	LMA
J	76	High-Risk MDS	+8	+/-	+/+	+/+	20 → AML	LMA
K	79	High-Risk MDS	A	+/+	+/+	+/+	16	Malattia Stabile
L	72	High-Risk MDS	+8	+/-	+/+	+/+	20 → AML	LMA
M	72	High-Risk MDS	A	+/+	+/+	+/+	11	Malattia Stabile
N	69	High-Risk MDS	+8	+/-	+/+	+/+	14 → AML	LMA
O	72	High-Risk MDS	A	+/-	+/+	+/+	5 → AML	LMA

Tabella 7. Pazienti affetti da MDS ad alto rischio con cariotipo normale

	Età	Diagnosi F.A.B.	Cariotipo	PI-PLCb1	PI-PLCb4	Tel 20p	Sopravvivenza (mesi)	Evoluzione
A	†70	High-Risk MDS	46,XX	+/-	+/+	+/+	† 8 → AML	LMA
B	68	High-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	20	
C	65	High-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	18	
D	72	High-Risk MDS	46,XY	+/-	+/+	+/+	7 → AML	LMA
E	71	High-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	18	
F	†64	High-Risk MDS	46,XY	+/-	+/+	+/+	† 2 → AML	LMA - Deceduto
G	70	High-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	19	Malattia Stabile
H	†61	High-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	† 22	Deceduto - Malattia Stabile
I	†78	High-Risk MDS	46,XY	+/-	+/+	+/+	† 16	Deceduto
J	63	High-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	8	Malattia Stabile
K	68	High-Risk MDS	46,XY	+/-	+/+	+/+	8 → AML	LMA
L	66	High-Risk MDS	46,XX	+/+	+/+	+/+	14	Malattia Stabile
M	63	High-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	8	Remissione Parziale
N	†63	High-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	† 13	Deceduto - Malattia Stabile
O	72	High-Risk MDS	46,XY	+/+	+/+	+/+	7	BMT-Remissione Completa

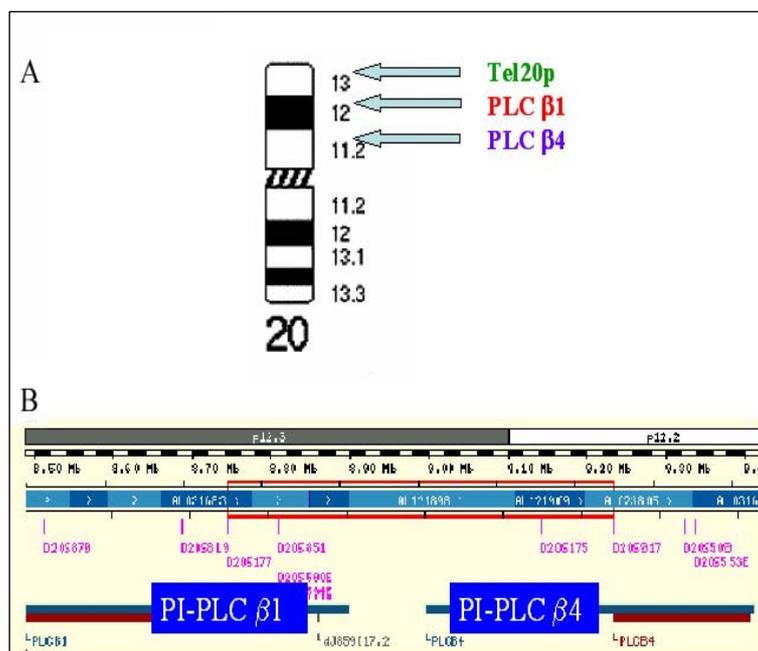


Figura 15. Locus dei geni analizzati mediante FISH. (A) Rappresentazione schematica del cromosoma 20 e della posizione dei geni analizzati mediante FISH. **(B)** Contesto genomico nel quale si trovano i geni della PI-PLCβ1 e PI-PLCβ4; come si può vedere dalla posizione dei marcatori genetici, la distanza fisica tra questi due geni è inferiore a 1Mb.

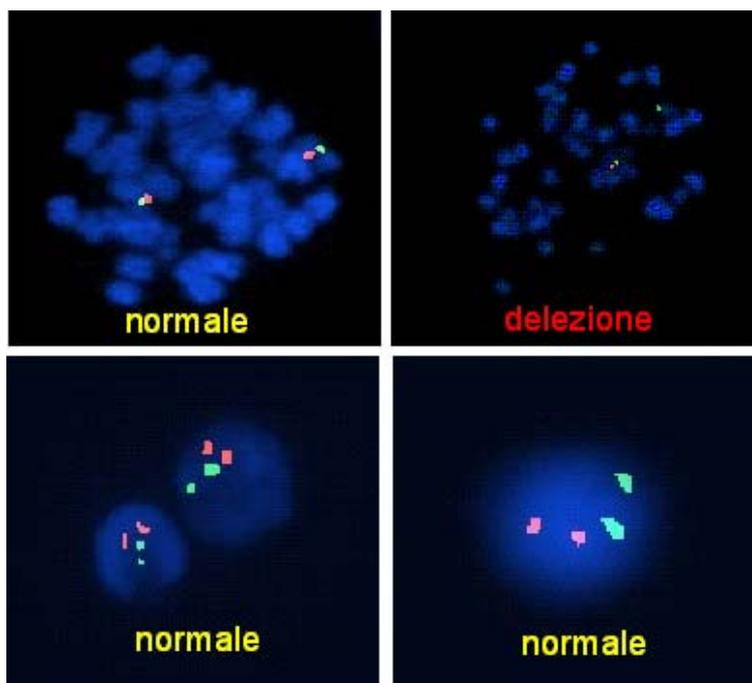


Figura 16. Analisi FISH in pazienti MDS. Le sonde specifiche per la PI-PLC β 1 e per la regione subtelomerica 20p, sono marcate rispettivamente in rosso e in verde. Nei pazienti MDS ad alto rischio, si osserva la mancanza di segnale derivante da una delle sonde specifiche per la PI-PLC β 1, indicando così la presenza della delezione mono-allelica del gene.

3. Analisi della Sequenza del gene della PI-PLC β 1 nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio

Partendo dal presupposto che nelle neoplasie è possibile riscontrare mutazioni geniche che possono essere coinvolte nei meccanismi patogenetici, è stata analizzata la sequenza del gene della PI-PLC β 1. In particolare, dal momento che la regione C-terminale del suddetto gene è ricca di sequenze funzionalmente importanti, è stata prestata maggiore attenzione alla zona compresa tra gli esoni 24 e 29, esaminando non solo la sequenza completa degli esoni, ma anche delle giunzioni esone-introne, in modo da verificare la presenza di eventuali mutazioni che potrebbero portare ad uno spostamento del *frameshift* durante le successive fasi di trascrizione e portare quindi ad alterazioni nella traduzione. L'analisi è stata effettuata estraendo il DNA genomico da pazienti affetti da MDS ad alto rischio; successivamente il DNA è stato amplificato mediante una reazione di Real-Time PCR, che permette di ottenere grandi quantità di amplificato da pochissimo materiale, e infine si è analizzata la sequenza dei frammenti amplificati.

Come si può vedere dalla figura 17, l'analisi di sequenziamento ha mostrato la presenza di una mutazione puntiforme negli esoni 28-29, che si trovano a pochissima distanza l'uno dall'altro e sono quindi stati analizzati insieme. La mutazione colpisce in particolare l'esone 29, in una

sequenza che a livello proteico induce un cambiamento sull'amminoacido 1064, che da acido glutammico diventa arginina. E' importante notare che da un residuo a carattere acido (glutammato) si passa ad uno a carattere basico (arginina), il che potrebbe teoricamente indurre modificazioni a livello strutturale. Inoltre, la regione del residuo 1064 è funzionalmente importante: l'amminoacido coinvolto nella mutazione si trova all'interno della sequenza di localizzazione nucleare (NLS) della PI-PLC β 1, per cui potrebbe indurre modificazioni anche a livello della localizzazione proteica.

L'analisi della sequenza è stata condotta su diversi pazienti affetti da MDS ad alto rischio: i pazienti con entrambi gli alleli del gene della PI-PLC β 1, sia a cariotipo normale che alterato, non hanno questa delezione. Invece, i pazienti portatori della delezione del gene della PI-PLC β 1 mostrano un comportamento diverso: alla diagnosi nessun paziente analizzato ha mostrato la mutazione E1064R. Invece, il trattamento con 5'-azacitidina sembra poter indurre la comparsa di tale mutazione, in quanto alcuni pazienti trattati con tale farmaco e la cui sequenza del gene della PI-PLC β 1 è stata analizzata durante la terapia, hanno presentato tale mutazione.

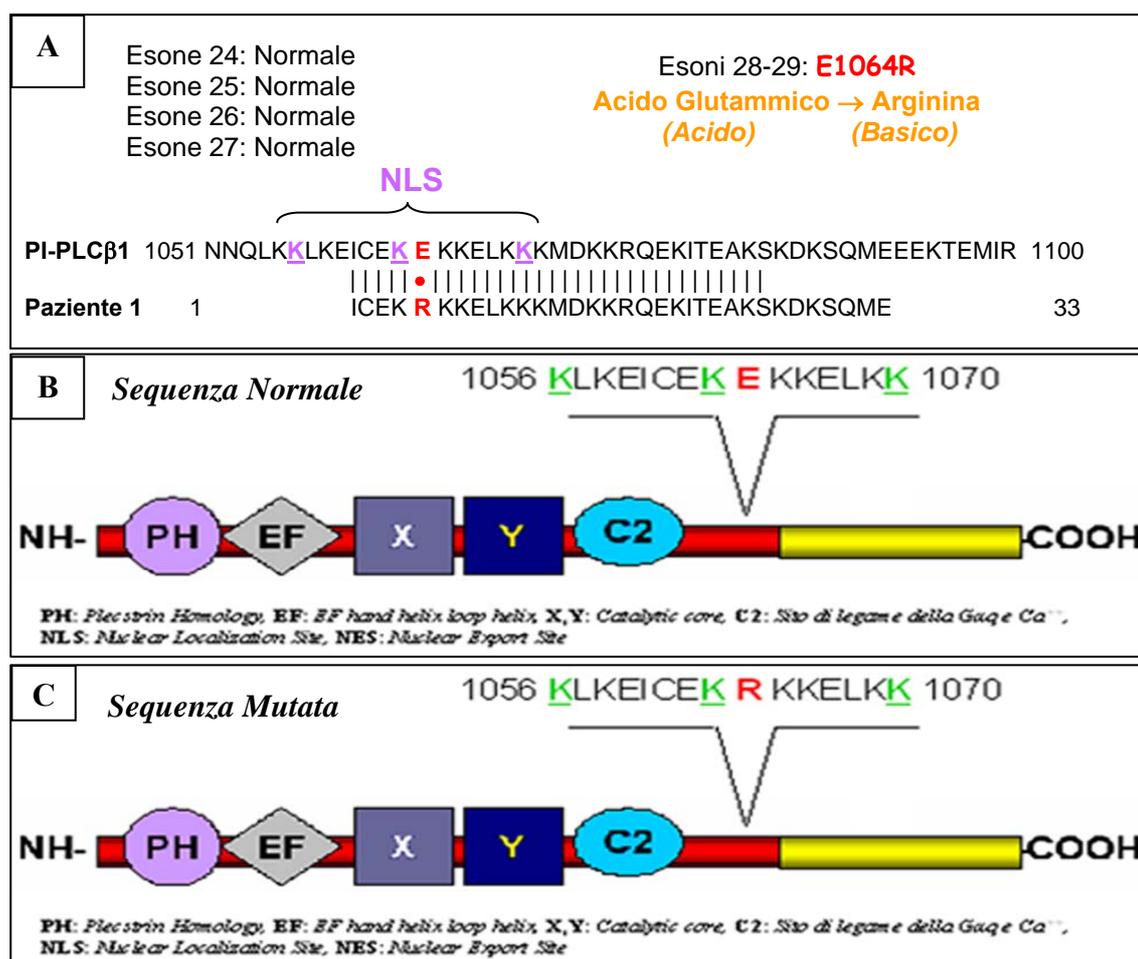


Figura 17. Analisi della sequenza del gene della PI-PLC β 1 nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio. (A) Analisi della sequenza degli esoni 24-29 della regione C-terminale della PI-PLC β 1 ed identificazione della mutazione puntiforme E1064R. (B) Sequenza normale del gene e posizione del residuo a livello della struttura proteica. (C) Sequenza mutata del gene e posizione del residuo a livello della struttura proteica.

4. Geni di riferimento per la reazione di Real-Time PCR

Il gene di riferimento endogeno per la quantificazione relativa è stato scelto in base ai risultati ottenuti effettuando una reazione di Real-Time PCR con una apposita piastra contenente 11 geni comunemente usati come *housekeeping*. L'analisi è stata condotta su cellule mononucleate isolate da tre donatori sani (Campioni A, B, C) e un paziente affetto da MDS ad alto rischio (Campione D). Come mostrato in Figura 18, i geni hanno mostrato variazioni di espressione; con i seguenti risultati, dal più stabile al meno stabile: B2M (*β -2-microglobulin*), GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), TBP (*TATA-binding protein*), PO (*acidic ribosomal protein*), TfR (*transferrin receptor*), HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase*), BA (*β -actin*), PGK (*phosphoglycerokinase*), GUS (*β -glucuronidase*), CYC (*cyclophilin*), 18S rRNA. I due geni meno variabili, e quindi potenzialmente buoni geni *housekeeping*, erano la B2M e la GAPDH; sebbene il gene che codifica per la B2M è stato usato come riferimento endogeno in altre reazioni di Real-Time PCR effettuate su cellule mononucleate da sangue periferico (Oselin et al, 2003), è stato deciso di utilizzare come gene *housekeeping* la GAPDH poiché coinvolta in processi completamente indipendenti dal sistema emopoietico.

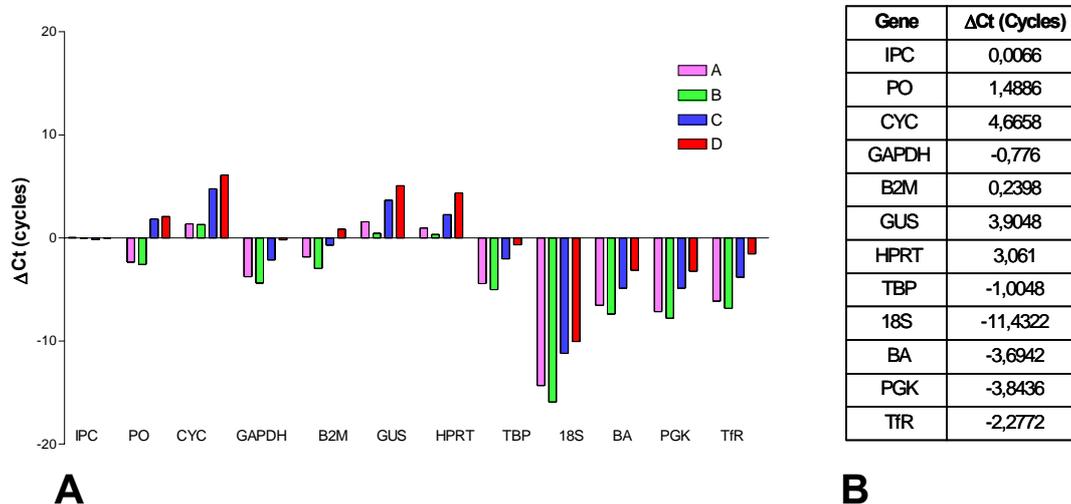


Figura 18. Risultati della piastra TaqMan human endogenous control per la scelta dei geni di riferimento per la reazione di RealTime-PCR. L'analisi è stata eseguita sulle cellule mononucleate ottenute da tre donatori sani (campioni A, B, C) e da un paziente MDS ad alto rischio (campione D). **(A)** La differenza di ciascun campione rispetto all'IPC (*Internal Positive Control*) è rappresentata dalle barre. **(B)** La tabella mostra i valori medi della differenza tra ciascun campione e l'Internal Positive Control (IPC).

5. Espressione genica delle forme trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b nei donatori sani e nelle cellule HL60

L'mRNA totale è stato estratto e retro-trascritto da cellule mononucleate ottenute da 10 donatori sani. E' stata quindi eseguita una prima reazione di real-Time PCR per valutare la quantità assoluta di PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b in questi campioni. Successivamente, i cDNA sono stati uniti tenendo conto dei risultati ottenuti da quest'analisi, in modo che tale miscela potesse essere usata come calibratore per l'analisi dei pazienti.

La linea cellulare HL60 è stata utilizzata come ulteriore controllo interno della metodica, dal momento che questa linea cellulare presenta una scarsa espressione di entrambi i trascritti della PI-PLC β 1. Infatti, usando come calibratore il *pool* di donatori sani (100%), la linea cellulare HL60 mostra la minore espressione di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLC β 1, con una diminuzione del 99% per la PI-PLC β 1a e un livello di PI-PLC β 1b del 6% rispetto ai donatori sani (Figure 19, 20).

6. Espressione genica delle forme trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio

La reazione di Real-Time PCR è stata condotta su pazienti affetti da MDS ad alto rischio di evoluzione in LMA e a cariotipo normale. Inoltre, è da sottolineare il fatto che questa prima analisi è stata effettuata su cellule mononucleate estratte da sangue midollare o periferico di pazienti alla diagnosi, non ancora soggetti ad alcun tipo di terapia. I risultati ottenuti utilizzando una sonda specifica per l'isozima PI-PLC β 1a mostrano che i pazienti affetti da MDS hanno un livello inferiore rispetto ai donatori sani. In particolare, considerando il livello dei donatori sani come 100%, la quantità relativa di PI-PLC β 1a nei pazienti è compresa tra 2 e 35%, come mostrato in Figura 19.

Allo stesso modo, con una sonda specifica per la PI-PLC β 1b, la maggior parte dei pazienti affetti da MDS mostra una minor espressione del corrispettivo mRNA (Figura 20). In questo caso, la variabilità tra pazienti è maggiormente visibile, poiché le quantità relative dei pazienti affetti da MDS variano da 5 a 94% rispetto ai donatori sani, considerati come 100%.

Infine, confrontando i risultati ottenuti con i due saggi, si può notare come la quantità relativa di PI-PLC β 1b sia costantemente superiore rispetto alla PI-PLC β 1a (Figura 21).

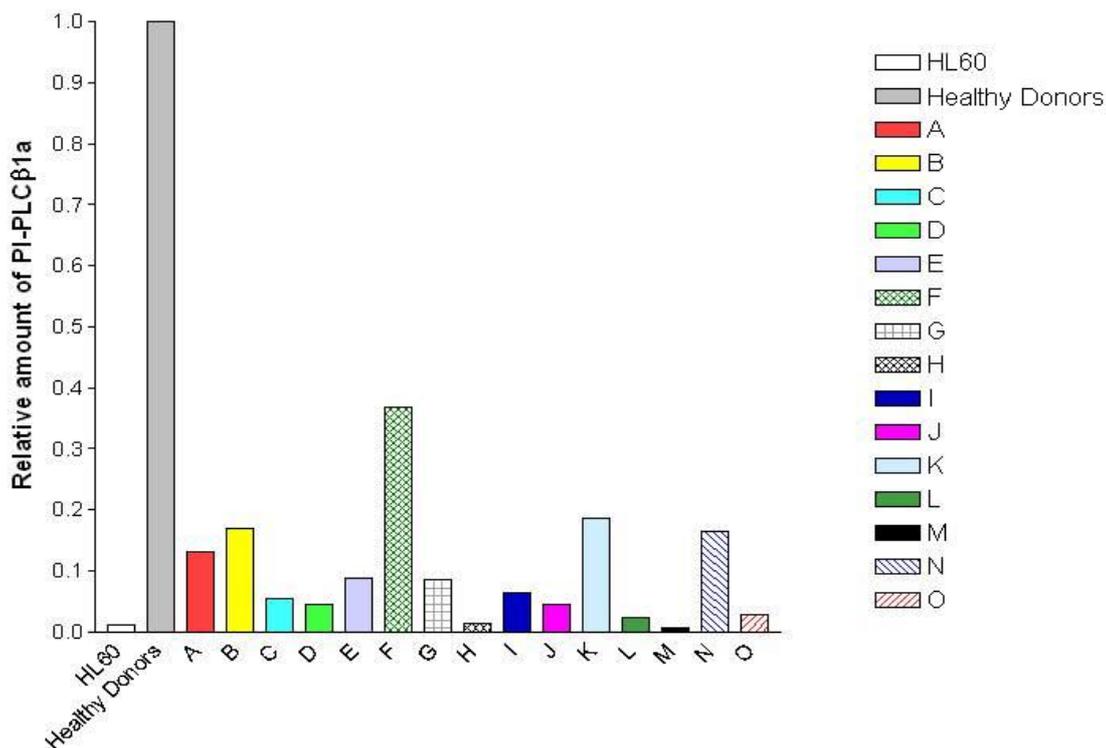


Figura 19. Quantificazione del trascritto della PI-PLCβ1a in pazienti affetti da MDS. Tutti i pazienti affetti da MDS (A-O) mostrano un'espressione della PI-PLCβ1a significativamente inferiore a quella osservata nei donatori sani e superiore a quella della linea cellulare HL60. La differenza è stata valutata in rapporto al gene della GAPDH e in base ai valori $2^{-\Delta\Delta C_t}$. I valori ottenuti sono tutti statisticamente significativi ($p < 0.01$ vs. donatori sani) e rappresentano la media \pm errore standard di tre diversi esperimenti. (Test di Dunnet dopo ANOVA).

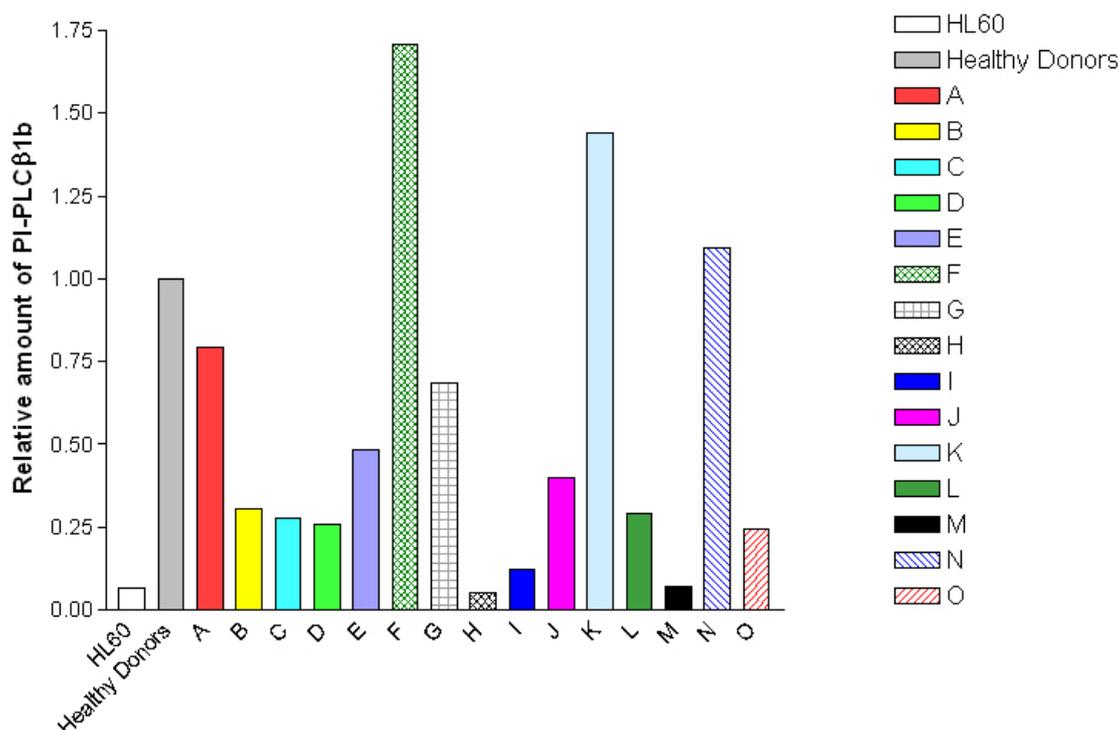


Figura 20. Quantificazione del trascritto della PI-PLCβ1b in pazienti affetti da MDS. Tutti i pazienti affetti da MDS (A-O) mostrano un'espressione genica significativamente alterata in confronto a quella osservata nei donatori sani e superiore a quella osservata nella linea cellulare HL60. La differenza è stata valutata in rapporto al gene della GAPDH e in base ai valori $2^{-\Delta\Delta C_t}$. I valori sono tutti statisticamente significativi ($p < 0.01$ vs. donatori sani) e rappresentano la media \pm errore standard di tre diversi esperimenti. (Test di Dunnet dopo ANOVA).

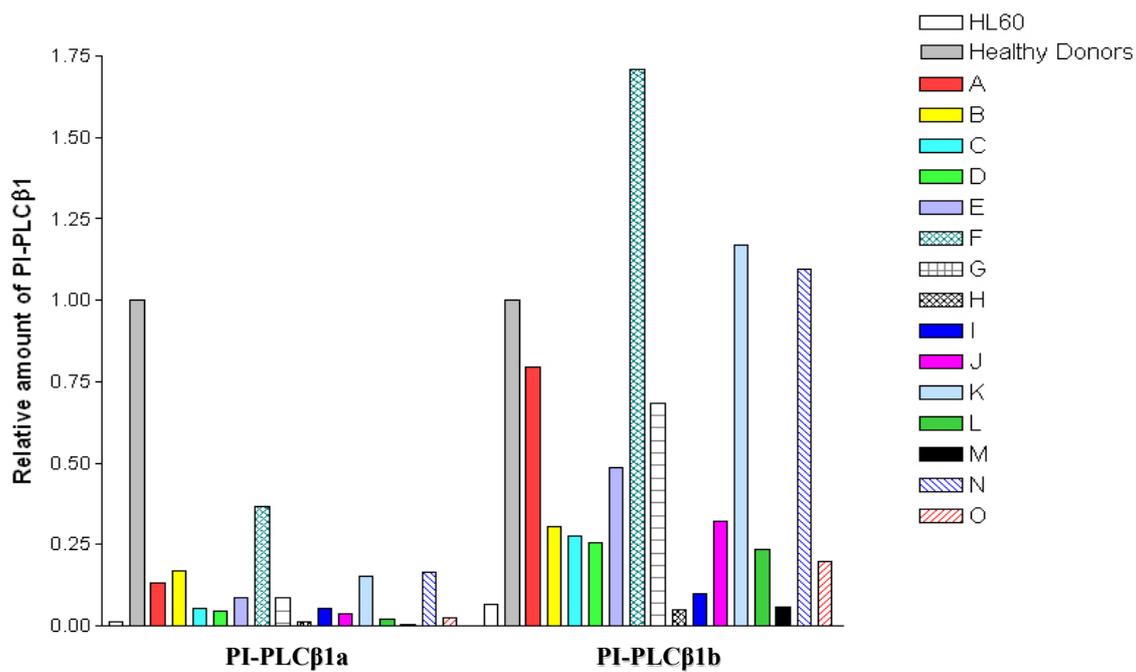


Figura 21. Confronto tra le quantità relative di trascritto della PI-PLCβ1a e PI-PLCβ1b in pazienti affetti da MDS. La quantità di trascritto della PI-PLCβ1b risulta sempre più alta rispetto alla quantità di trascritto della PI-PLCβ1a.

7. Espressione genica delle forme trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio in seguito a trattamento con 5'-azacitidina

Dato che ai pazienti in esame era somministrata 5'-azacitidina, è stata eseguita una quantificazione dei trascritti delle forme trascrizionali PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b in seguito a questo trattamento. In particolare, l'analisi è stata condotta su un paziente particolarmente responsivo alla suddetta terapia, di cui si avevano a disposizione prelievi successivi corrispondenti ai diversi cicli di trattamento. Il suddetto paziente è stato sottoposto a cicli successivi di terapia con 5'-azacitidina, raggiungendo uno stato di remissione parziale secondo le linee guida dettate dall'International Working Group (IWG); in seguito, i valori ematologici del paziente hanno infatti indicato la presenza di una condizione di miglioramento ematologico, con una maggiore risposta eritroide e piastrinica.

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

Come mostrato in Figura 22, il paziente prima del trattamento presenta una minore espressione sia della PI-PLC β 1a che della PI-PLC β 1b, rispetto ai donatori sani. In Figura 23 e 24, invece, sono rappresentati i livelli di emoglobina e piastrine del paziente, che servono ad indicare lo stato clinico del soggetto: in particolare, il paziente è considerato in una condizione clinica migliore qualora i livelli di emoglobina siano intorno a 11 g/dL e le piastrine superiori a 100.000, mentre è considerato in uno stato clinico peggiore quando tali livelli si abbassano.

E' interessante notare che durante la somministrazione di 5'-azacitidina il paziente ha mostrato un aumento dei livelli di mRNA di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLC β 1. Inoltre, è da sottolineare che l'evoluzione clinica del paziente presenta un andamento simile a quanto osservato per i livelli di PI-PLC β 1: quando il paziente si trova in condizioni cliniche migliori (Prelievi A-E), valutate grazie ai livelli di emoglobina e piastrine, anche la PI-PLC β 1 mostra valori superiori rispetto ai donatori sani, indicando un'induzione dell'espressione genica; d'altro canto, quando il paziente è entrato in uno stato clinico peggiore (Prelievi F-K), in cui i livelli di emoglobina e piastrine iniziano ad abbassarsi, anche i livelli di PI-PLC β 1 hanno iniziato a diminuire.

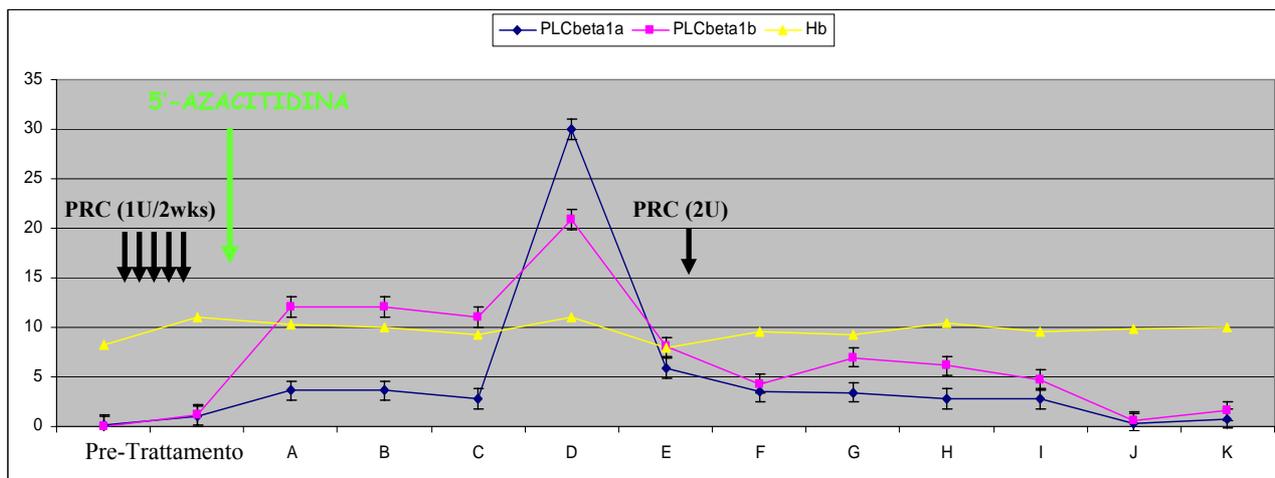


Figura 22. Quantificazione dei trascritti della PI-PLCβ1 in un paziente affetto da MDS e sottoposto a terapia con 5'-azacitidina. Alla diagnosi, il paziente mostra livelli di PI-PLCβ1 inferiori rispetto ai donatori sani. Durante il trattamento con 5'-azacitidina (Prelievi A-K), si nota un'induzione dell'espressione genica di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLCβ1, con quantità relative maggiori rispetto ai donatori sani. In particolare, l'aumento è crescente durante il periodo di risposta maggiore al farmaco (Prelievi A-E), mentre si ha una diminuzione durante il periodo successivo (Prelievi F-K), in cui il paziente si trova in uno stato clinico peggiore.

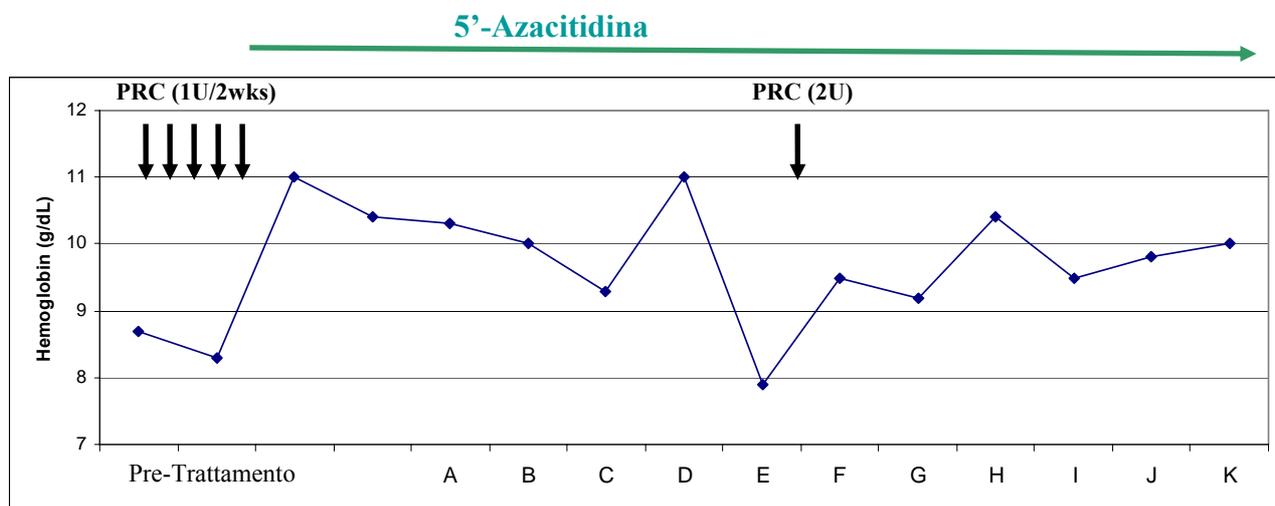


Figura 23. Quantificazione dei livelli di emoglobina in un paziente affetto da MDS e sottoposto a terapia con 5'-azacitidina. Alla diagnosi, il paziente mostra bassi livelli di emoglobina. Durante il trattamento con 5'-azacitidina (Prelievi A-K), si nota un aumento dei livelli di emoglobina. In particolare, l'aumento è crescente durante il periodo di risposta maggiore al farmaco (Prelievi A-E), mentre si ha una diminuzione durante il periodo successivo (Prelievi F-K), in cui il paziente si trova in uno stato clinico peggiore.

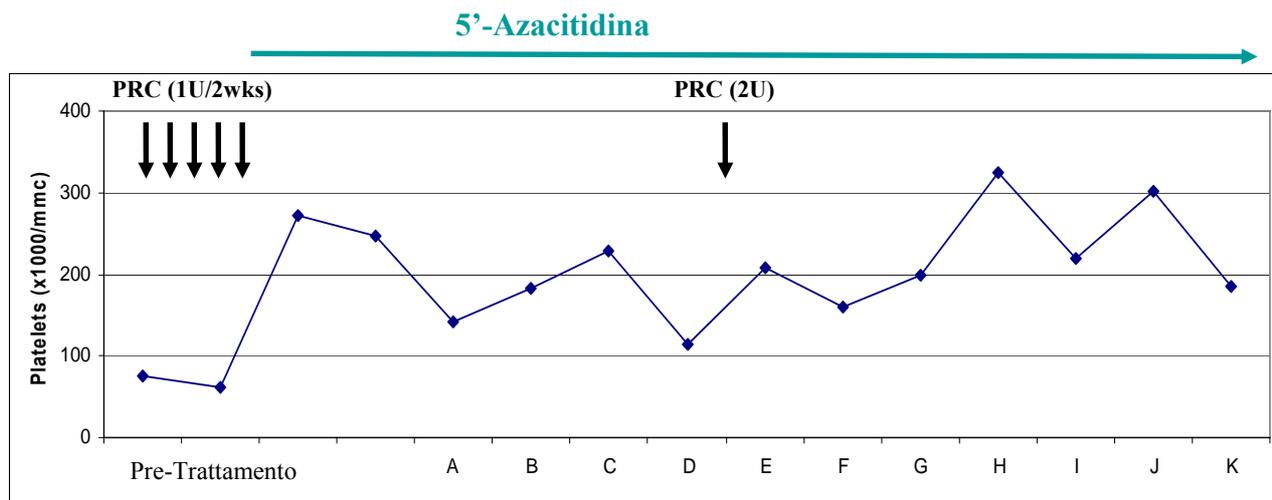


Figura 24. Quantificazione dei livelli di piastrine in un paziente affetto da MDS e sottoposto a terapia con 5'-azacitidina. Alla diagnosi, il paziente mostra bassi livelli di piastrine. Durante il trattamento con 5'-azacitidina (Prelievi A-K), si nota un aumento dei livelli di piastrine. In particolare, l'aumento è crescente durante il periodo di risposta maggiore al farmaco (Prelievi A-E), mentre al prelievo F i livelli sono scesi intorno a 100.000, per cui è stata necessaria una trasfusione (PRC-2U), nel complesso in quest'ultimo periodo (Prelievi F-K) il paziente si trova in uno stato clinico peggiore.

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

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

Per quanto riguarda l'analisi dei livelli di espressione e di attivazione (fosforilazione), di Akt e della via mTOR/p70S6K/p4E-BP1, sono stati eseguiti degli esperimenti anche mediante Western Blotting. Mediante l'utilizzo di un anticorpo diretto contro Akt si è visto che esso era espresso sia nelle cellule CEM che nelle cellule HL60. L'attivazione della proteina, rivelata mediante l'uso di un anticorpo specifico verso la forma fosforilata di Akt nel residuo Ser473, era infatti presente nelle cellule CEM, ma non nelle cellule HL60, che sono state quindi considerate rispettivamente come riferimento positivo e negativo per i successivi esperimenti di immunocitochimica. Inoltre, è stata

studiata anche l'attivazione di Erk1/2 nelle suddette linee cellulari, dal momento che è stato dimostrato che Akt interagisce con Erk1/2 (Ricciardi MR et al, 2005); Akt può infatti fosforilare e regolare negativamente Raf, che a sua volta attiva la via di segnalazione MEK/Erk1/2. I risultati ottenuti, utilizzando un anticorpo specifico verso i residui fosforilati Thr202/Tyr204, mostrano che nelle cellule CEM la via di sopravvivenza Erk1/2 è scarsamente attivata, mentre nelle cellule HL60 sono presenti livelli maggiori di proteina fosforilata. In tutte le analisi in Western Blotting eseguite, la β -actina è stata utilizzata per stabilire se eventuali differenze di espressione delle proteine in esame non fossero dovute a differenze di carica nella corsa elettroforetica (Figura 25).

Dal momento che uno dei bersagli molecolari a valle di Akt è mTOR, a sua volta coinvolto in una via di segnalazione cellulare, è stata verificata anche la specificità degli anticorpi coinvolti in tale asse di attivazione: p-mTOR, p-p70S6K e p-4E-BP1 (Figura 26). Anche in questo caso le indagini sono state eseguite con metodi di Western Blotting e di immunocitochimica; l'attivazione dell'asse mTOR/p70S6K/4EBP1 è stata osservata nelle cellule CEM, mentre non era presente nella linea cellulare HL60.

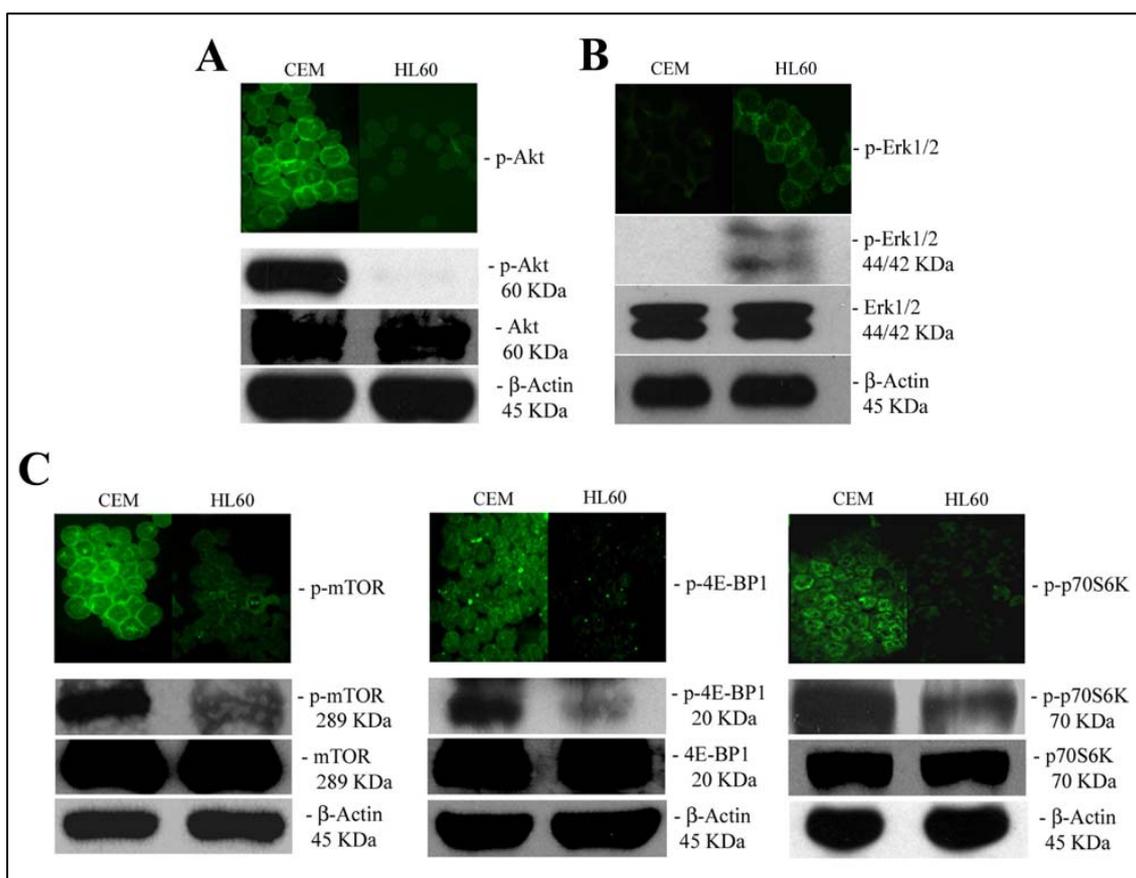


Figura 25. Stato di attivazione della via Akt/mTOR nelle cellule CEM e HL60. Analisi mediate Western Blotting e Immunocitochimica (Ingrandimento originale x 600) condotta su cellule CEM e HL60. Sono stati caricati 75 μ g di proteina per ogni campione analizzato. (A) Ser473 p-Akt e Akt totale; (B) Thr202/Tyr204 p-Erk1/2 e Erk1/2 totale; (C) Ser2448 p-mTOR e mTOR totale; Ser65 p-4E-BP1 e 4E-BP1 totale; Thr389 p-p70S6K e p70S6K totale. In condizioni basali, le cellule CEM presentano scarsi livelli di p-Erk1/2, mentre le cellule HL60 mostrano un'intensità maggiore. D'altro canto, nelle cellule HL60 non c'è attivazione della via Akt/mTOR, mentre la linea cellulare CEM mostra attivazione di tale via di sopravvivenza, con alti livelli di p-Akt, p-mTOR, p-p70S6K e p-4EBP1. La β -actina è stata usata come gene di riferimento per controllare le differenze di carica.

9. Studio dell'Espressione Proteica della PI-PLC β 1 nelle MDS mediante Analisi Immunocitochimica

Tutti i pazienti affetti da MDS sono stati sottoposti ad analisi immunocitochimica, in modo da determinare possibili variazioni quantitative dell'espressione della PI-PLC β 1. In questo studio abbiamo usato un anticorpo primario che riconosce, senza distinguere, entrambi gli isoismi della PI-PLC β 1 [Rabbit polyclonal anti PI-PLC β 1 (#R-233), Santa Cruz Biotechnology]. Infatti, come mostrato nella Figura 26, sia il compartimento nucleare che quello citoplasmatico risultano positivi; il segnale mostra una prevalenza nucleare, poiché in questo compartimento si localizzano entrambi gli isoismi 1a e 1b della PI-PLC β 1, mentre nel citoplasma è presente solo l'isozima 1a (Bahk YY et al, 1998). I livelli di proteina osservati nei campioni derivati dai pazienti affetti da MDS risultano notevolmente più bassi di quelli osservati nei campioni derivati da donatori sani (Figura 26). Quindi, in conformità a quanto osservato con l'analisi FISH, nei pazienti affetti da MDS, sembra che la mancanza di uno degli alleli della PI-PLC β 1 possa indurre una ridotta espressione della proteina. Tuttavia, ogni singolo paziente mostra un proprio profilo d'espressione della PI-PLC β 1 che dipende anche dalle condizioni cliniche personali, per cui esistono delle variazioni nell'intensità del segnale anche tra pazienti che apparentemente hanno lo stesso stato allelico. In particolare, potrebbero esistere alterazioni post-trascrizionali che impediscono il corretto svolgimento del processo traduzionale.

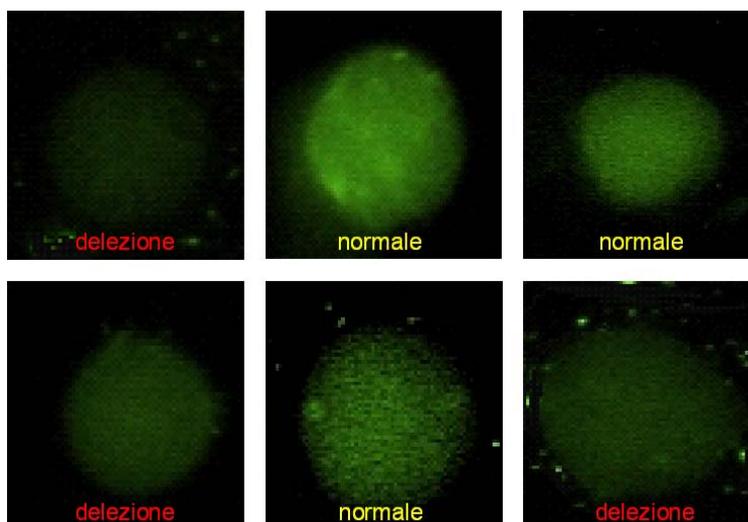


Figura 26. Analisi immunocitochimica della PI-PLC β 1 in pazienti affetti da MDS. L'espressione proteica degli isoismi della PI-PLC β 1 osservata nei pazienti affetti da MDS risulta alterata rispetto a quella osservata nei donatori sani. I pazienti portatori della delezione mostrano livelli proteici inferiori rispetto ai pazienti con entrambi gli alleli. Tuttavia, ogni singolo paziente mostra un proprio profilo d'espressione della PI-PLC β 1 che dipende anche dalle condizioni cliniche personali.

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

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

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

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

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

Come mostrato in Figura 27, i donatori sani presentano una scarsa espressione di p-Akt, che invece è maggiore nei pazienti affetti da MDS, con i casi ad alto rischio che mostrano livelli di attivazione più elevati rispetto ai pazienti affetti da MDS a basso rischio. Gli anticorpi usati sono specifici, in quanto si può vedere che la marcatura è prevalentemente a livello citoplasmatico.

Inoltre, sono state effettuate anche analisi con anticorpi specifici per la forma totale di p-Akt, in modo da verificare che l'attivazione fosse specifica (Figura 27). I risultati ottenuti da quest'indagine mostrano che i livelli di Akt totale restano invariati, non essendoci differenza tra donatori sani e pazienti affetti da MDS, indicando quindi che l'attivazione di Akt è specifica.

Le Tabelle 8 e 9 mostrano le caratteristiche dei pazienti di cui è stata studiata la via di attivazione di Akt e i risultati ottenuti dalle analisi immunocitochimiche per ciascun paziente esaminato, in una scala arbitraria che assegna 0 al controllo negativo (cellule HL60) e 5 al controllo positivo (cellule CEM). Come si può vedere, i pazienti che mostrano livelli di p-Akt maggiori o uguali a 3 presentano attivazione della via mTOR/p S6K/p4EBP1, mentre pazienti con valori di p-Akt minori di 3 non hanno alti livelli di fosforilazione nelle proteine esaminate.

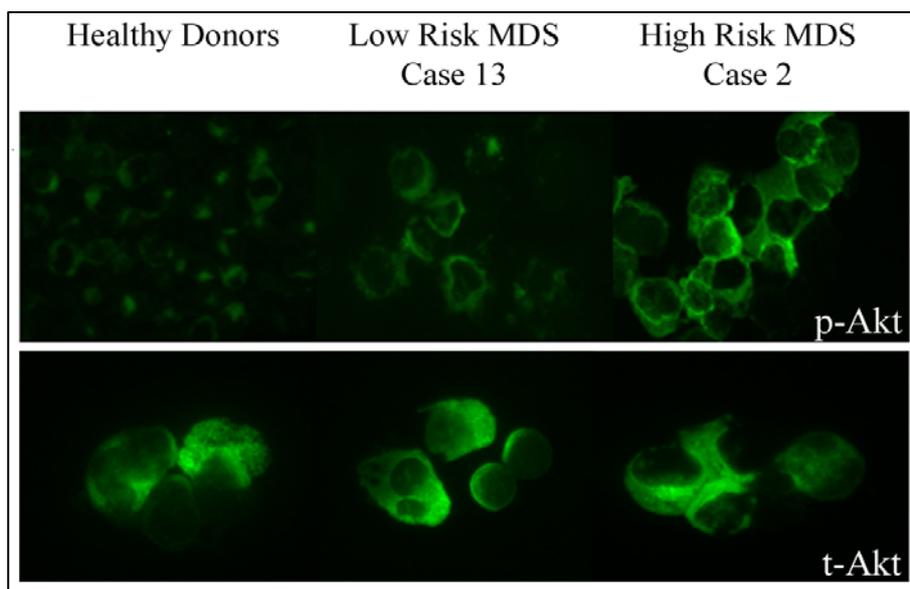


Figura 27. Analisi immunocitochimica di p-Akt in pazienti affetti da MDS. L'espressione proteica di p-Akt osservata nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio risulta maggiore rispetto a quella osservata nei donatori sani, indicando attivazione delle vie di segnalazione Akt-dipendenti. I pazienti affetti da MDS a basso rischio hanno un'espressione di p-Akt intermedia, che indica una lieve attivazione delle suddette vie.

Tabella 8. Caratteristiche dei pazienti affetti da MDS di cui è stata studiata l'attivazione dell'asse Akt/mTOR.

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

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

†Più di tre aberrazioni cromosomiche

Tabella 9. Espressione di Ser473 p-Akt, Ser2448 p-mTOR, Ser65 p-4E-BP1 and Thr389 p-p70S6K in pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio.

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

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

11. Studio del Fenotipo di Akt nelle MDS mediante Analisi al Citofluorimetro in un paziente affetto da MDS in seguito a trattamento con 5'-azacitidina

Dal momento che lavorando con campioni biologici di pazienti non è possibile avere a disposizione abbastanza cellule per poter applicare metodiche di analisi proteica quali il Western Blotting, si è pensato di utilizzare un metodo di analisi al citofluorimetro per la rilevazione di p-Akt. Infatti, l'analisi dell'espressione di p-Akt è stata effettuata tramite l'uso di un anticorpo diretto contro il residuo Ser473 di p-Akt e coniugato in modo diretto con il fluorocromo FITC, che emette nel verde. In questo modo, è stato possibile analizzare il fenotipo delle cellule mononucleate dei pazienti affetti da MDS. La linea cellulare Jurkat, che esprime in modo costitutivamente alto p-Akt, in quanto presenta una delezione completa di PTEN, e la linea cellulare HL60, che ha invece una bassa espressione di p-Akt, sono state utilizzate come controllo per questo tipo di esperimento. Per quanto riguarda i pazienti affetti da MDS, l'analisi è stata condotta su un paziente affetto da MDS ad alto rischio e sottoposto a trattamento con 5'-azacitidina.

Come mostrato in Figura 28, le cellule Jurkat e HL60 rappresentano rispettivamente il controllo positivo e negativo per questa analisi. Il paziente mostra un'alta espressione di p-Akt alla diagnosi, mentre il trattamento con 5'-azacitidina induce una progressiva diminuzione della proteina fosforilata, indicando quindi un calo nell'attivazione dell'asse PI3K/Akt.

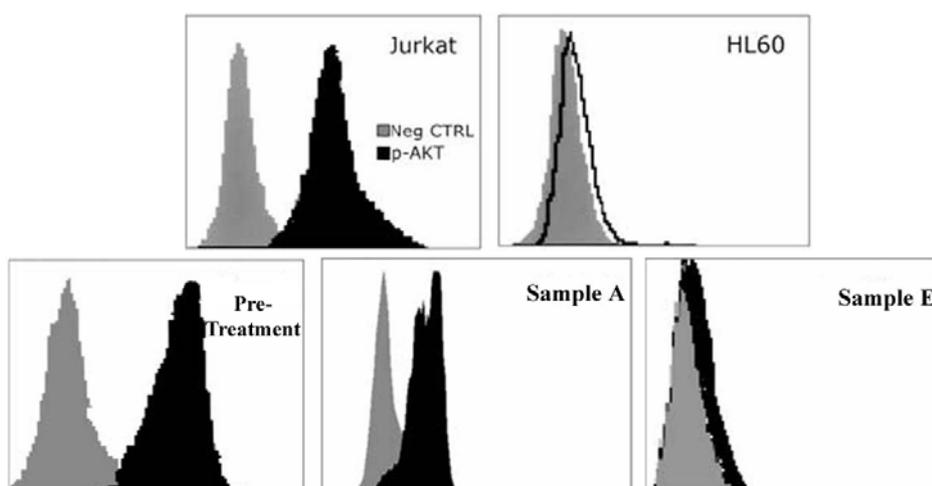


Figura 28. Analisi del fenotipo di Akt in un paziente affetto da MDS e trattato con 5'-azacitidina. Le cellule Jurkat e HL60 rappresentano il controllo positivo e negativo per questo tipo di analisi. Il paziente alla diagnosi mostra un'alta espressione di p-Akt, che diminuisce progressivamente in seguito al trattamento con 5'-azacitidina fino a diventare negativo.

12. Studio dell'Espressione Proteica di Akt e PI-PLC β 1, mediante Analisi Immunocitochimica, in un paziente affetto da MDS in seguito a trattamento con 5'-azacitidina

Dato che il trattamento con 5'-azacitidina ha dimostrato avere un effetto sull'espressione genica sia della PI-PLC β 1a che della PI-PLC β 1b e sul fenotipo di p-Akt, è stata effettuata anche un'indagine immunocitochimica sulle cellule mononucleate del paziente già analizzato tramite Real-Time PCR e citofluorimetria e sottoposto a questo tipo di trattamento.

L'analisi è stata condotta per quantificare i livelli proteici di p-Akt e della PI-PLC β 1. Come mostrato in figura 29, la somministrazione di 5'-azacitidina ha indotto un aumento di espressione della PI-PLC β 1, come già ipotizzato dall'aumento del corrispondente mRNA. In particolare, come già evidenziato dal livello di mRNA, c'è un progressivo aumento di PI-PLC β 1 (Prelievi A-D) fino ad un picco massimo di espressione (Prelievo E), relativo ad un periodo in cui il paziente era stato considerato in remissione completa, dopodichè la quantità di proteina inizia a diminuire (Prelievi F-K), in corrispondenza di un periodo in cui il paziente è stato considerato in remissione parziale.

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

Infine, sono stati valutati anche i livelli di PIP₂, substrato della PI-PLC β 1 e intermediario tra le due vie di traduzione del segnale, in quanto, come già descritto in precedenza, il PIP₂ viene trasformato in PIP₃, il quale interagisce con Akt per la sua attivazione e trasformazione in p-Akt. Come mostrato in Figura 29 e 30, i livelli di PIP₂ correlano con quanto osservato per la PI-PLC β 1, in quanto PIP₂ mostra delle fluttuazioni che seguono i livelli di PI-PLC β 1 e p-Akt durante il trattamento. In particolare, la Figura 30 è una rappresentazione schematica delle quantità delle tre proteine esaminate, valutando le intensità secondo una scala arbitraria che assegna il valore 0 al controllo negativo e 5 al controllo positivo, rappresentati rispettivamente dalle cellule HL60 e CEM analizzate per p-Akt. Nella Tabella sono rappresentati i valori relativi ai prelievi del paziente durante il trattamento, mentre nel grafico è rappresentato l'andamento complessivo delle tre proteine esaminate.

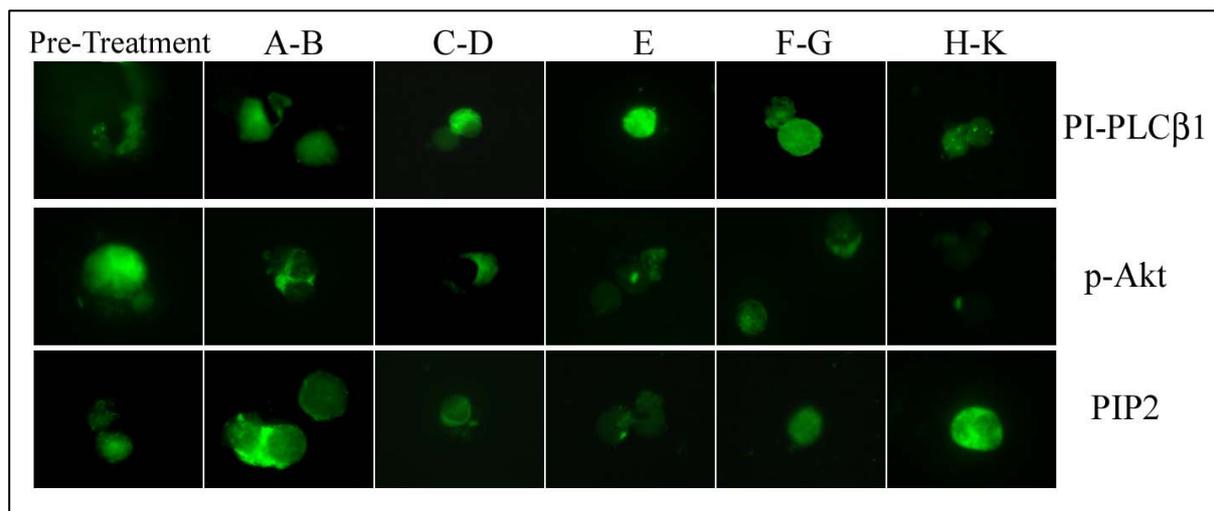


Figura 29. Analisi Immunocitochimica durante la somministrazione di 5'-azacitidina. Alla diagnosi, l'intensità di p-Akt è massima, mentre è minima quella della PI-PLC β 1. Durante la prima parte del trattamento (Prelievi A-D), i livelli di PI-PLC β 1 aumentano, mentre diminuiscono quelli di p-Akt. In seguito si ha un picco massimo di espressione per la PI-PLC β 1 (Prelievo E), in corrispondenza di una quantità molto scarsa di p-Akt. Infine, durante l'ultima parte di terapia (Prelievi F-K), durante i quali il paziente è considerato in remissione parziale, i livelli sia della PI-PLC β 1 che di p-Akt tendono a stabilizzarsi, con la PI-PLC β 1 che mostra un'espressione maggiore rispetto a p-Akt.

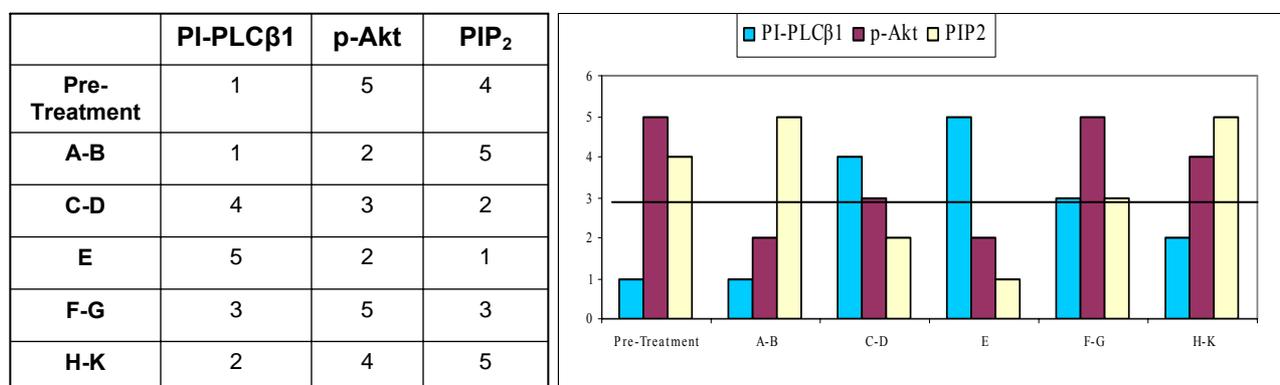


Figura 30. Quantificazione di PI-PLC β 1, p-Akt e PIP $_2$ durante il trattamento con 5'-azacitidina. Nella tabella sono rappresentati i valori arbitrari assegnati alle diverse intensità delle tre proteine esaminate, secondo una scala in cui il valore 0 corrisponde al controllo negativo (quantità di p-Akt nelle cellule HL60) e 5 al controllo positivo (quantità di p-Akt nelle cellule CEM). Nel grafico sono rappresentate, invece, le fluttuazioni delle tre proteine durante le diverse fasi del trattamento e della risposta clinica del paziente.

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

Essendo mTOR uno dei bersagli molecolari a valle di Akt, è stata studiata l'espressione di tale proteina sia in donatori sani che in pazienti affetti da MDS, attraverso metodiche di immunocitochimica. I pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano alti livelli di Ser2448 p-mTOR, mentre i donatori sani e i pazienti affetti da MDS a basso rischio presentano una minore attivazione (Figura 31A).

Dal momento che mTOR può, a sua volta, interagire con altri due effettori a valle, 4EBP1 e p70S6K, è stata analizzata anche l'attivazione di tali proteine, mediante l'uso di anticorpi specifici verso residui fosforilati che indicano attivazione di tale via di trasduzione. Come mostrato in Figura 31C, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio presentano attivazione di tale via, mentre sia i donatori sani che i pazienti affetti da MDS a basso rischio hanno bassi livelli di fosforilazione a carico di tali proteine. L'immagine è rappresentativa delle diverse analisi effettuate: i casi di MDS ad alto rischio mostrano sempre una maggiore intensità delle proteine dell'asse Akt/mTOR rispetto ai donatori sani e ai casi di MDS a basso rischio, che invece hanno intensità minori. I dati ottenuti per ogni singolo paziente sono riportati nella Tabella 9.

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

Infine, come precedentemente evidenziato, è noto che Akt può interagire con Erk1/2. Quindi sono stati condotti esperimenti di immunocitochimica per valutare l'attivazione di Erk1/2 nei donatori sani e nei pazienti affetti da MDS. Come mostrato in Figura 31B, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio presentano scarse quantità di proteina fosforilata, mentre i donatori sani e i pazienti affetti da MDS a basso rischio mostrano attivazione di tale via di segnalazione. Le Tabelle 8 e 9 mostrano le caratteristiche dei pazienti di cui è stata studiata la via di attivazione di Akt e i risultati ottenuti per ciascun paziente esaminato, in una scala arbitraria che assegna 0 al controllo negativo (cellule HL60) e 5 al controllo positivo (cellule CEM).

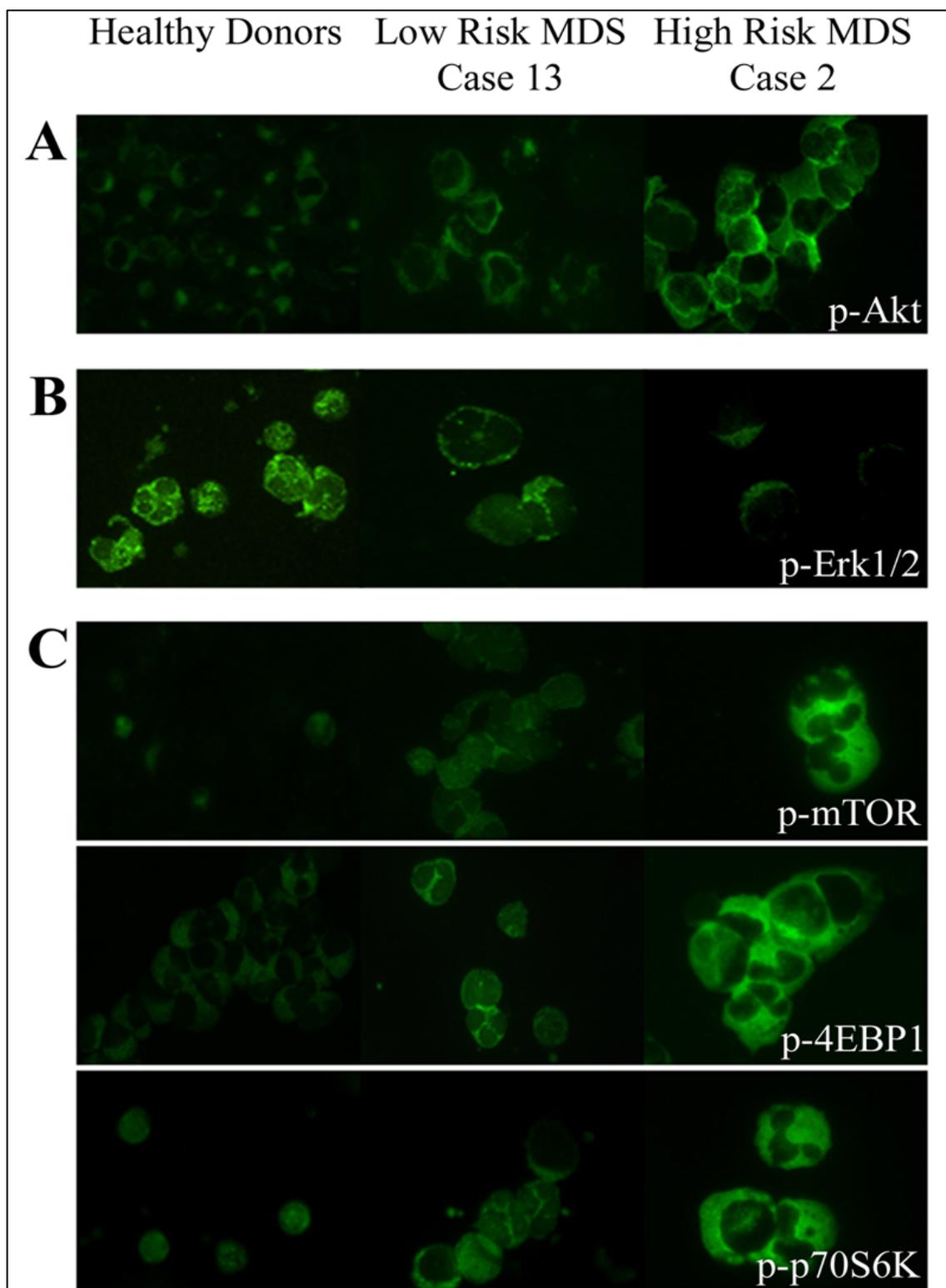


Figura 31. Analisi Immunocitochimica di p-Akt, p-mTOR; p-4E-BP1 e p-p70S6K in donatori sani e pazienti affetti da MDS. Analisi Immunocitochimica (Ingrandimento originale x 600) condotta su donatori sani e pazienti affetti da MDS, di cui sono raffigurati due casi rappresentativi: uno per i pazienti a basso rischio (Caso n. 13) e uno ad alto rischio (Caso n. 2) (A) Ser473 p-Akt; (B) Thr202/Tyr204 p-Erk1/2; (C) Ser2448 p-mTOR , Ser65 p-4E-BP1 e Thr389 p-p70S6K.

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

A partire dai risultati ottenuti mediante le analisi immunocitochimiche, che evidenziavano un'attivazione della via di trasduzione del segnale Akt/mTOR, sono stati condotti alcuni esperimenti per identificare quale fosse il *lineage* emopoietico coinvolto, in modo da valutare il coinvolgimento delle cellule staminali emopoietiche. Per questo motivo è stato utilizzato un marcatore specifico del *lineage* mieloide, CD33 (Knapp W et al, 1994) ed uno del *lineage* eritroide, CD71 (Kowal-Vern A et al, 2000). Come mostrato in Figura 32, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio che erano positivi per CD33 mostravano un'alta espressione sia di p-Akt che di p-mTOR; al contrario, le cellule che presentavano alti livelli di CD71 mostravano scarse quantità di p-Akt e di p-mTOR, indicando quindi che il *lineage* coinvolto nell'attivazione dell'asse Akt/mTOR era quello delle cellule staminali mieloidi.

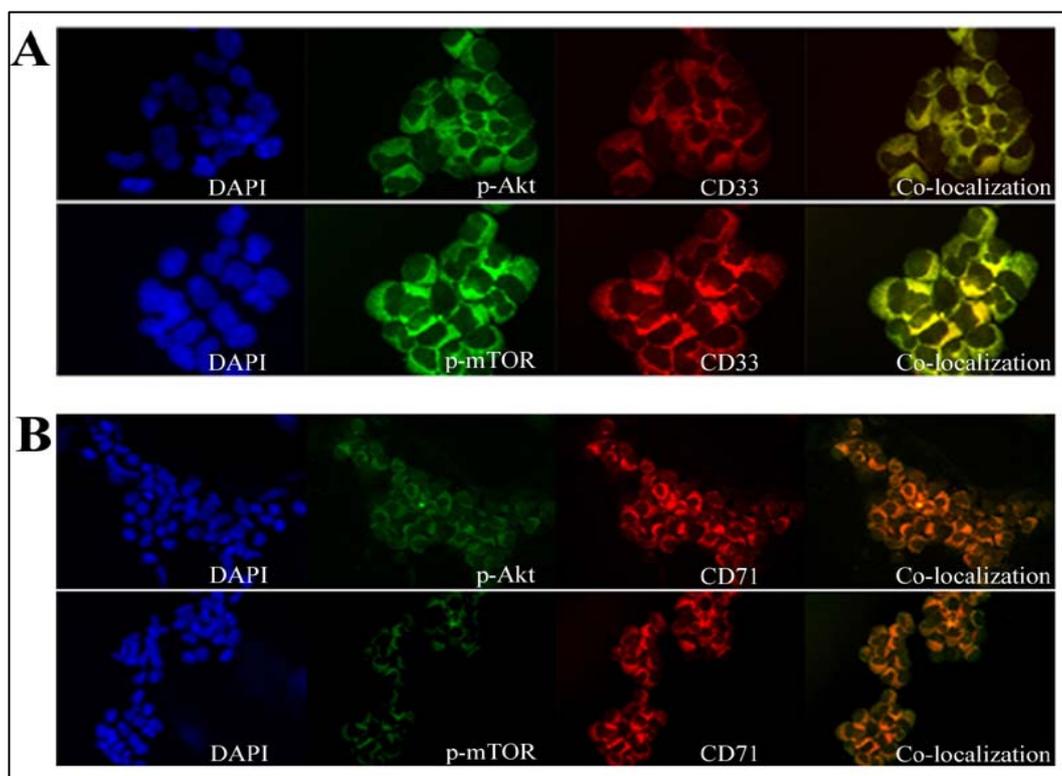


Figura 32. Identificazione del *lineage* coinvolto nell'attivazione di Akt e nelle MDS ad alto rischio. Analisi Immunocitochimica (Ingrandimento originale x 600) condotta su pazienti affetti da MDS ad alto rischio. I nuclei sono visualizzati mediante colorazione con DAPI (segnale blu) (A) Ser473 p-Akt o Ser2448 p-mTOR in pazienti affetti da MDS ad alto rischio (segnale verde). Le cellule CD33⁺ sono state identificate mediante l'uso di un anticorpo specifico coniugato con PE (segnale rosso). La sovrapposizione delle due immagini indica lo stato di co-localizzazione delle proteine esaminate (segnale giallo). (B) Ser473 p-Akt o Ser2448 p-mTOR in pazienti affetti da MDS ad alto rischio (segnale verde). Le cellule CD71⁺ sono state identificate mediante l'uso di un anticorpo specifico coniugato con PE (segnale rosso). La sovrapposizione delle due immagini indica lo stato di co-localizzazione delle proteine esaminate (segnale arancione).

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

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

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

Per quanto riguarda l'effetto della rapamicina, essa ha indotto piccole variazioni nelle percentuali di cellule apoptotiche dei donatori sani e dei pazienti affetti da MDS a basso rischio, sia nelle cellule CD33⁺ che nelle cellule CD33⁻. Al contrario, le cellule dei pazienti affetti da MDS ad alto rischio sembrano più sensibili a tale trattamento, con un aumento significativo nella frazione di cellule CD33⁺ rispetto alle cellule CD33⁻ (Figura 33A). Inoltre, poiché uno studio recente ha evidenziato che la rapamicina può indurre attivazione di Akt attraverso un meccanismo di *feedback* negativo, sono stati analizzati i livelli di p-Akt nelle stesse cellule sottoposte a tale trattamento. Nelle suddette condizioni sperimentali però, l'inibizione di mTOR mediante rapamicina non ha indotto ulteriore espressione di p-Akt (Figura 33B).

Al contrario, il trattamento con LY294002 non ha indotto variazioni significative nella percentuale di cellule apoptotiche dei soggetti esaminati, mentre le cellule CEM, usate come controllo, hanno mostrato un'alta sensibilità verso tale sostanza (Figura 33C). Considerando che LY294002 non ha avuto effetti significativi sulle percentuali di cellule apoptotiche delle frazioni CD33⁺ dei pazienti affetti da MDS, è stata analizzata anche la sequenza della subunità catalitica p110 α del gene della PI3K, dal momento che mutazioni attivanti di tale gene sono state dimostrate in diversi tipi di patologie tumorali (Bousquet M et al., 2005; Liu Z et al., 2006). In ogni caso, nessun paziente analizzato ha evidenziato la presenza di mutazioni a carico del gene esaminato (Tabella 9).

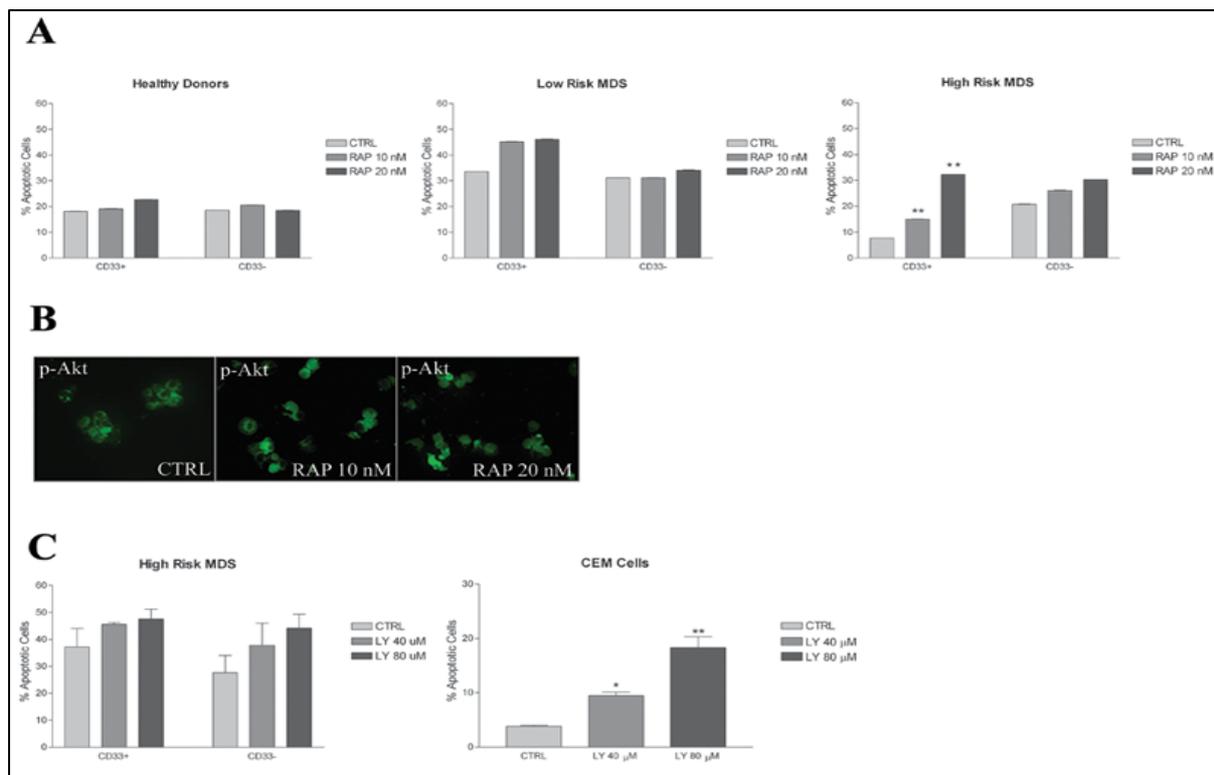


Figura 33. La rapamicina, ma non LY294002, aumenta in modo selettivo la percentuale di cellule apoptotiche nella frazione di cellule CD33⁺ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio. (A) Analisi al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche nelle cellule CD33⁺ e CD33⁻ di donatori sani e pazienti affetti da MDS a basso e ad alto rischio, in seguito a trattamento con dosi crescenti di rapamicina (0nM, 10nM, 20nM) per 48h. Non sono evidenziabili differenze statisticamente significative nella popolazione di cellule apoptotiche dei donatori sani né dei pazienti affetti da MDS a basso rischio. Al contrario, i pazienti affetti da MDS ad alto rischio mostrano un aumento significativo delle cellule apoptotiche CD33⁺, mentre la frazione CD33⁻ non presenta differenze sostanziali. Gli istogrammi rappresentano la media dei risultati di tre esperimenti indipendenti \pm SD. * $p < 0.05$ vs. CTRL; ** $p < 0.01$ vs. CTRL (Test di Dunnet dopo ANOVA). (B) Analisi immunocitochimica eseguita su cellule CD33⁺ dopo trattamento con rapamicina per 48h (Ingrandimento originale x600). Alle concentrazioni usate (0nM, 10nM, 20nM) non c'è aumento significativo di p-Akt, indicando che la rapamicina non attiva Akt tramite meccanismi di feedback. RAP: rapamicina. (C) Analisi al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche nelle cellule CD33⁺ e CD33⁻ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio e cellule CEM, in seguito a trattamento con dosi crescenti di LY294002 (0 μ M, 40 μ M, 80 μ M) per 24h. Non sono evidenziabili differenze statisticamente significative nella popolazione di cellule apoptotiche dei pazienti affetti da MDS ad alto rischio, sia nella frazione CD33⁺ che CD33⁻, mentre le cellule CEM sono sensibili a tale trattamento. Gli istogrammi rappresentano la media dei risultati di tre esperimenti indipendenti \pm SD. * $p < 0.05$ vs. CTRL; ** $p < 0.01$ vs. CTRL (Test di Dunnet dopo ANOVA).

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

In questo studio è stato anche analizzato l'effetto della rapamicina e di LY294002 sulla capacità clonogenica delle cellule CD34⁺ dei pazienti affetti da MDS. Le cellule CD34⁺, estratte da campioni di sangue midollare di donatori sani e pazienti affetti da MDS, sono state piastrate in un terreno di metilcellulosa in presenza di concentrazioni crescenti di rapamicina o LY294002. Le colonie e i cluster sono stati contati dopo 14 giorni di coltura (Figura 34). Secondo quanto osservato da Nissen-Druey (Nissen-Druey C et al, 2005), le cellule CD34⁺ dei pazienti affetti da MDS davano origine a poche, piccole colonie, caratterizzate da aggregati di macrofagi ed eosinofili. Al contrario, le cellule CD34⁺ derivanti da donatori sani mostravano un normale processo differenziativo, in tutti i *lineage* emopoietici (eritroide, linfoide, mieloide). La rapamicina non aveva effetti sulla capacità clonogenica delle cellule CD34⁺ dei donatori sani. Per quanto riguarda i pazienti affetti da MDS a basso rischio, essi mostravano una lieve diminuzione, seppur non significativa, della crescita delle colonie dopo trattamento, rispetto a quanto osservato nei donatori sani (Figura 35A-B). Al contrario, il numero e la grandezza delle colonie derivanti dalle cellule CD34⁺ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio erano significativamente inferiori dopo trattamento, per cui la rapamicina mostra un effetto di inibizione della crescita delle colonie in modo dose-dipendente (Figura 35C). Per quanto riguarda LY294002, tale sostanza non riduce in modo sostanziale la crescita delle colonie nei pazienti affetti da MDS (Figura 35D).

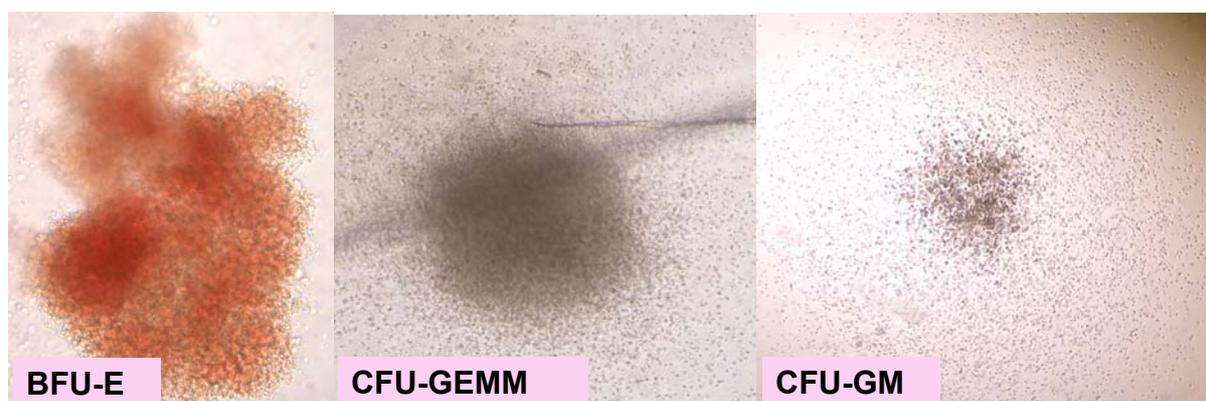


Figura 34. Saggio clonogenico in pazienti affetti da MDS. Immagine rappresentativa di alcune colonie appartenenti a diversi lineage emopoietici cresciuti dopo incubazione in metilcellulosa

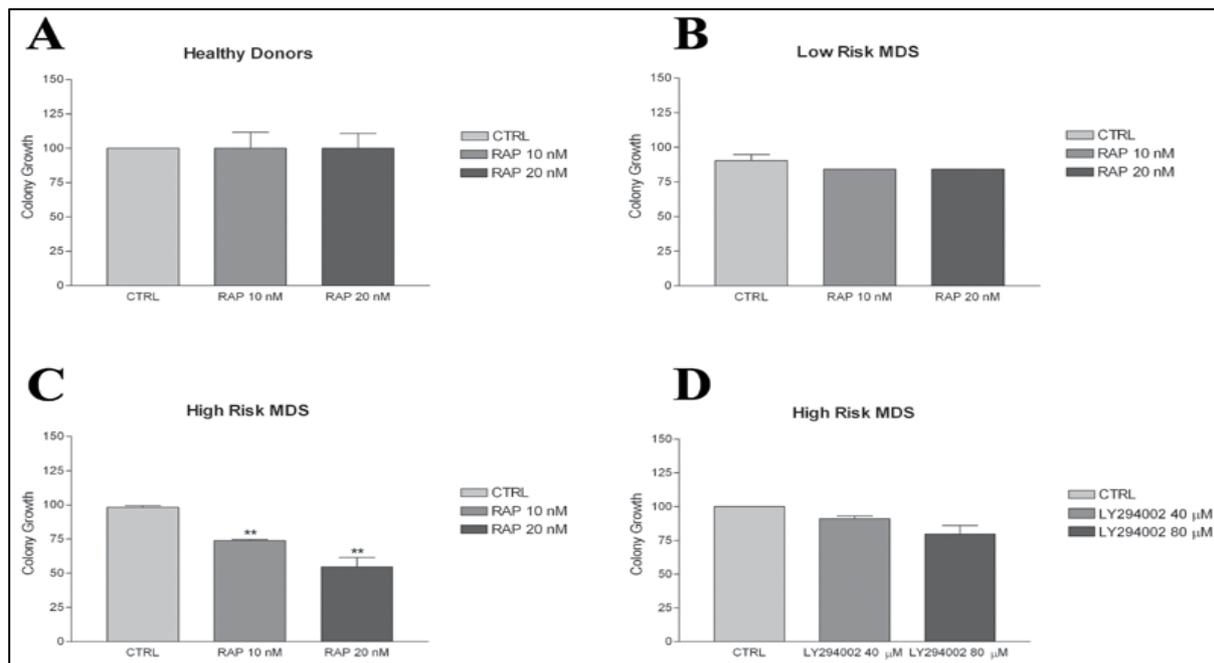


Figura 35. La rapamicina, ma non LY294002, inibisce la capacità clonogenica delle cellule CD34⁺ di pazienti affetti da MDS ad alto rischio. Le cellule CD34⁺ estratte da donatori sani e pazienti affetti da MDS sono state incubate in presenza di concentrazioni crescenti di rapamicina o LY294002. Le colonie (>50cellule) o i cluster (<50cellule) sono state valutate dopo 14 giorni di coltura. (A) Donatori sani: la rapamicina non ha effetti sulla crescita delle colonie; (B) pazienti affetti da MDS a basso rischio: la rapamicina induce una lieve diminuzione del numero e della grandezza delle colonie, che non è statisticamente significativa; (C) pazienti affetti da MDS ad alto rischio: la rapamicina riduce significativamente il numero e la grandezza delle colonie. RAP: rapamicina. (D) Pazienti affetti da MDS ad alto rischio: LY294002 riduce leggermente, ma non significativamente, il numero e la grandezza delle colonie. I risultati sono espressi come percentuale rispetto al controllo e rappresentano la media dei risultati di tre esperimenti indipendenti \pm SD. * $p < 0.05$ vs. CTRL; ** $p < 0.01$ vs. CTRL (Test di Dunnett dopo ANOVA).

DISCUSSIONE

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

Recentemente, è stato dimostrato che le vie di segnalazione fosfoinositide-dipendente possono essere coinvolte nella progressione delle sindromi mielodisplastiche (MDS) in leucemia mieloide acuta (LMA).

Innanzitutto, è stato visto che pazienti affetti da MDS possono presentare una delezione monoallelica a carico del gene della PI-PLC β 1; tale mutazione potrebbe essere correlata ad una peggiore prognosi rispetto a pazienti con entrambe le copie del gene, in quanto i pazienti che mostrano la delezione hanno avuto un decorso clinico peggiore (Lo Vasco VR et al, 2004; Lo Vasco VR et al, 2006). E' interessante notare che la delezione è stata osservata solo nei pazienti ad alto rischio di evoluzione in LMA, indicando che la PI-PLC β 1 potrebbe avere un ruolo nella patogenesi delle MDS. Inoltre, dalle analisi citogenetiche risulta che la delezione è interstiziale e specifica, dal momento che sia il gene della PI-PLC β 4 sia la regione su-telomerica del braccio corto del cromosoma 20 sono normali anche nei campioni che presentano delezione.

Poiché alcuni tipi di tumore, soprattutto a livello ematologico, sono caratterizzati da mutazioni geniche, è stata analizzata la sequenza della PI-PLC β 1 nei pazienti affetti da MDS. I risultati ottenuti mostrano l'esistenza di una mutazione puntiforme E1064R che non sembra indurre modificazioni sensibili sulla localizzazione cellulare o sul differenziamento, ma sembra essere invece correlata ad un miglioramento terapeutico indotto dal trattamento sperimentale cui sono sottoposti i pazienti di questo studio. Infatti, ai pazienti affetti da MDS inclusi in questo studio è stato somministrato un farmaco sperimentale che inibisce l'azione delle DNA metil-transferasi, denominato 5'-azacitidina.

A partire dai risultati ottenuti dalle indagini sul DNA genomico, si è deciso di analizzare l'espressione genica di entrambi gli isozimi della PI-PLC β 1, mediante un approccio di Real-Time PCR semi-quantitativa (Follo MY et al, 2006). Questo tipo di analisi si è focalizzato su pazienti affetti da MDS ad alto rischio e a cariotipo normale. Invece, i donatori sani e le cellule HL60 sono stati usati come controllo per l'affidabilità e la riproducibilità del metodo in reazioni successive. In particolare, un pool di donatori sani è stato usato come calibratore, mentre il gene della GAPDH è stato utilizzato come controllo endogeno, in modo da determinare eventuali differenze dovute alla qualità e quantità dell'RNA estratto, oppure a differenze nell'efficienza della retro-trascrizione nei diversi campioni. I risultati ottenuti mostrano che l'espressione della PI-PLC β 1 è alterata nei casi di

MDS ad alto rischio. Infatti, tutti i pazienti analizzati hanno mostrato una notevole diminuzione dei livelli di PI-PLC β 1a. Per quanto riguarda i livelli di PI-PLC β 1b, si è visto che anche in questo caso l'espressione era alterata, in quanto nella maggior parte dei casi l'mRNA era inferiore rispetto ai donatori sani. Nel complesso, i dati ottenuti indicano che una riduzione dei trascritti della PI-PLC β 1 è frequentemente presente nei pazienti affetti da MDS ad alto rischio. E' da notare che i livelli di PI-PLC β 1b sono costantemente superiori a quanto ottenuto con la sonda della PI-PLC β 1a; tale differenza potrebbe essere conseguenza di un effetto della diversa localizzazione delle proteine corrispondenti. Infatti, la PI-PLC β 1a si distribuisce sia a livello nucleare che citoplasmatico, mentre la PI-PLC β 1b si localizza prevalentemente nel nucleo.

Le analisi sopra descritte sono state effettuate sui diversi pazienti al momento della diagnosi; i pazienti, tuttavia, sono stati sottoposti a diversi cicli di 5'-azacitidina. Per questo motivo, è stata effettuata un'analisi in Real-Time PCR in un paziente affetto da MDS, particolarmente responsivo a tale farmaco e di cui erano a disposizione prelievi per ogni ciclo di trattamento. Gli esperimenti effettuati hanno mostrato che il trattamento con 5'-azacitidina potrebbe avere effetti sull'espressione dell'mRNA della PI-PLC β 1, dal momento che durante il trattamento si è visto un aumento dei livelli di entrambi i trascritti. Nel primo prelievo analizzato, effettuato prima di iniziare il trattamento, i livelli di entrambe le forme trascrizionali della PI-PLC β 1 erano inferiori rispetto ai donatori sani. Durante il primo periodo di somministrazione del farmaco, in cui il paziente ha raggiunto un miglioramento ematologico sia a livello dell'emoglobina che delle piastrine, è interessante notare un notevole e progressivo incremento dei livelli di mRNA. In seguito, quando il paziente è entrato in uno stato clinico leggermente peggiore, anche i livelli di PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b hanno iniziato a diminuire, mantenendosi però più elevati rispetto ai donatori sani e al periodo di pre-trattamento. E' possibile ipotizzare che la 5'-azacitidina possa avere effetti importanti sulla PI-PLC β 1, anche se non è ancora stato chiarito se c'è un coinvolgimento dell'enzima in processi di metilazione del DNA.

I risultati finora descritti indicano che la PI-PLC β 1 è alterata nelle MDS ad alto rischio sia a livello genomico che trascrizionale. Sono state dunque effettuate analisi a livello proteico, per studiare l'eventuale coinvolgimento della PI-PLC β 1 nei meccanismi di proliferazione e differenziamento cellulare. Infatti, è stato dimostrato che la PI-PLC β 1 nucleare può indurre la progressione lungo il ciclo cellulare nelle cellule di eritroleucemia murina di Friend (Faenza I et al, 2000); dal momento che, il complesso ciclina D3/cdk4 è attivato in modo specifico dalla PI-PLC β 1. Inoltre, è stato osservato non solo che la proteina Rb è fosforilata, ma anche che il fattore E2F-1 è attivato, indicando un coinvolgimento della PI-PLC β 1 nei meccanismi di proliferazione cellulare.

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

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

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

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

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

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

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

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

Recentemente, alcuni studi hanno osservato che la rapamicina potrebbe attivare Akt attraverso un meccanismo di *feedback* negativo, ma le condizioni sperimentali descritte in questo studio non hanno mostrato ulteriore attivazione di Akt. Inoltre, esperimenti di immunocitochimica, condotti su cellule di pazienti affetti da MDS per verificare l'espressione di Erk1/2, hanno evidenziato che tale proteina è fosforilata, e quindi attivata, in donatori sani e pazienti affetti da

MDS a basso rischio, ma non nei casi ad alto rischio. Tale fenomeno distingue le MDS dalle LMA, dove è attivo sia Akt che Erk1/2 (Ricciardi MR et al, 2005).

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

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

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

BIBLIOGRAFIA

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

Bahk YY, Song H, Baek SH, Park BY, Kim H, Ryu SH, Suh PG. Localization of two forms of phospholipase C-beta1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1389:76-80.

Barragan M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campas C, Castano E, Santirian AF et al, Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C {beta}. *J Leukoc Biol*. 2006; 80:1473-9.

Billottet C, Grandage VL, Billottet C, Grandage VL, Gale RE, Quattropani A, Rommel C, Vanhaesebroeck B, Khwaja A. A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene*. 2006;25:6648-6659.

Bousquet M, Recher C, Queleen C, Demur C, Payrastra B, Brousset P. Assessment of somatic mutations in phosphatidylinositol 3-kinase gene in human lymphoma and acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2005;131:411-413.

Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwable J, et al. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res*. 2005;65:9643-9650.

Cappellini A, Tabellini G, Zweyer M, Bortul R, Tazzari PL, Billi AM, et al. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway regulates cell cycle progression of HL60 human leukemia cells through cytoplasmic relocalization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) and control of cyclin D1 expression. *Leukemia*. 2003;17:2157-2167.

Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Rhee SG, Manzoli FA. Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1530:1-14.

Faenza I, Bavelloni A, Fiume R, Lattanzi G, Maraldi NM, Gilmour, R. S, et al. Up-regulation of nuclear PLCbeta1 in myogenic differentiation. *J Cell Physiol*. 2003;195:446-452.

Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, et al. A role for nuclear phospholipase Cbeta 1 in cell cycle control. *J Biol Chem*. 2000;275:30520-30524.

Fiume R, Faenza I, Matteucci A, Astolfi A, Vitale M, Martelli AM, Cocco L. Nuclear phospholipase C beta1 (PLCbeta1) affects CD24 expression in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem*. 2005;280:24221-24226.

Follo MY, Lo Vasco VR, Martinelli G, Palka G, Cocco L. PLCB1 (phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. December 2005 .
URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PLCB1ID41742ch20p12.html>

Follo MY, Bosi C, Finelli C, et al. Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLCβ1 gene expression in myelodysplastic syndrome. *Int J Mol Med*. 2006;18:267-271.

Follo MY, Mongiorgi S, Bosi C, Cappellini A, Finelli C, Chiarini F, et al. The Akt/mammalian Target of Rapamycin (mTOR) signal transduction pathway is activated in high risk myelodysplastic syndromes and influences cell survival and proliferation *Cancer Res*. 2007 (in press)

- Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul CN. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res.* 2000;24:983-992.
- Giles FJ, Albitar M. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in leukemia. *Curr Mol Med.* 2005;5:653-661.
- Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia.* 2005;19:586-594.
- Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-2088.
- Huang W, Chang HY, Fei T, Wu H, Chen YG. GSK3beta mediates suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN. *Oncogene.* 2006
- Irvine RF. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4: 349-360.
- Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry.* 1994;18:187-198.
- Kowal-Vern A, Mazzella FM, Cotelingam JD, Shrit MA, Rector JT, Schumacher HR. Diagnosis and characterization of acute erythroleukemia subsets by determining the percentages of myeloblasts and proerythroblasts in 69 cases. *Am J Hematol.* 2000;65:5-13.
- Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol.* 2004;35:255-262.
- Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *J Biol Chem.* 1992;267:16044-16047.
- Liu Z, Roberts TM. Human tumor mutants in the p110alpha subunit of PI3K. *Cell Cycle.* 2006;5:675-677.
- Lo Vasco VR, Calabrese G, Manzoli L, Palka G, Spadano A, Morizio E, Guanciali-Franchi P, Fantasia D and Cocco L. Inositide-specific phospholipase c beta1 gene deletion in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2004;18:1122-1126.
- Lo Vasco VR, Follo MY, Cocco L. Reply to Herens et al. *Leukemia.* 2006;20:522-3.
- Lukinovic-Skudar V, Donlagic L, Banfic H and Visnjic D: Nuclear phospholipase C-beta1b activation during G2/M and late G1 phase in nocodazole-synchronized HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1733:148-156.
- Malaponte G, Libra M, Gangemi P, et al. Detection of BRAF gene mutation in primary choroidal melanoma tissue. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:225-227.
- Mantovani I, Cappellini A, Tazzari PL, et al. Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells. *J Cell Physiol.* 2006;207:836-844.

- Manzoli L, Billi AM, Rubbini S, Bavelloni A, Faenza I, Gilmour RS, et al. Essential role for nuclear phospholipase C beta1 in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis. *Cancer Res.* 1997;57:2137-2139.
- Markovic A, MacKenzie KL, Lock RB. FLT-3: a new focus in the understanding of acute leukemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1168-1172.
- Martelli AM, Billi AM, Gilmour RS, Neri LM, Manzoli L, Ognibene A. et al. Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend cells: phospholipase C beta down-regulation is related to cell differentiation. *Cancer Res.* 1994;54:2536-2540.
- Martelli AM, Billi AM, Manzoli L, Faenza I, Aluigi M, Falconi M, et al. Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) beta1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation. *FEBS Lett.* 2000;486:230-236.
- Martelli AM, Fiume R, Faenza I, Tabellini G, Evangelista C, Bortul R, et al. Nuclear phosphoinositide specific phospholipase C (PI-PLC)-beta 1: a central intermediary in nuclear lipid-dependent signal transduction. *Histol Histopathol.* 2005;20:1251-1260.
- Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L, Cocco L. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature.* 1992;358:242-245.
- Martelli AM, Manzoli L, Cocco L. Nuclear inositides: facts and perspectives. *Pharmacol Ther.* 2004;101:47-64.
- Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2006;20:911-928.
- Martelli, AM, Tabellini G, Bortul R, et al. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol.* 2005;20:239-252.
- Matteucci A, Faenza I, Gilmour RS, Manzoli L, Billi AM, Peruzzi D, et al. Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C beta 1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 1998;58:5057-5060.
- Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, et al. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia.* 2003;17:995-997.
- Mori N, Morosetti R, Hoflehner E, Lubbert M, Mizoguchi H and Koeffler HP: Allelic loss in the progression of myelodysplastic syndrome. *Cancer Res.* 2000;60:3039-3042.
- Nissen-Druey C, Tichelli A, Meyer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol.* 2005;113:5-96.
- Nyakern M, Tazzari PL, Finelli C, et al. Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia.* 2006;20:230-238.

Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem.* 1993;268:4573-4576.

Peruzzi D, Aluigi M, Manzoli L, Billi AM, Di Giorgio FP, Morleo M, et al. Molecular characterization of the human PLC beta1 gene. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1584:46-54.

Peruzzi D, Calabrese G, Faenza I, Manzoli L, Matteucci A, Gianfrancesco F, Billi AM, Stuppia L, Palka G and Cocco L: Identification and chromosomal localisation by fluorescence in situ hybridisation of human gene of phosphoinositide-specific phospholipase C beta(1). *Biochim Biophys Acta.* 2000;1484:175-182.

Platzbecker U, Haase M, Herbst R, et al. Activity of sirolimus in patients with myelodysplastic syndrome-results of a pilot study. *Br J Haematol.* 2005;128:625-30.

Razzini G, Brancaccio A, Lemmon MA, Guarnirei S, Falasco M. The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta(1). *J Biol Chem.* 2000;275:14873-14881.

Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;105:2527-2534.

Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:281-312.

Ricciardi MR, McQueen T, Chism D, et al. Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2005;19:1543-1549.

Rizvi MA, Ghias K, Davies KM, et al. Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C α inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1783-1789.

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

Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, et al. Essential role for the p110 δ isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;106:1063-1066.

Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J Cell Physiol.* 2005;202:623-634.

Tee AR, Blenis J. mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16:29-37.

Trost D, Hildebrandt B, Muller N, Germing U, Royer-Pokora B. Hidden chromosomal aberrations are rare in primary myelodysplastic syndromes with evolution to acute myeloid leukaemia and normal cytogenetics. *Leuk Res.* 2004;28: 171-177.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* . 2002;100:2292-2302.

Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, et al. Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res*. 2006;66:6589-6597.

Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*. 2005;16:525-537.

Xu, A., Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, Gilmour RS. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2981-2990.

Xu RH, Pelicano H, Zhang H, Giles FJ, Keating MJ, Huang P. Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia*. 2005;19:2153-2158.

Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, et al. Phase I/II Study of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Everolimus (RAD001) in Patients with Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5165-5163.

Zeng Z, Samudio IJ, Zhang W, Estrov Z, Pelicano H, Harris D, et al. Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2006;66:3737-3746.

**PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI
CON COLLEGIO DI REVISORI**

1. Follo MY, Lo Vasco VR, Martinelli G, Palka G, Cocco L. PLCB1 (phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 2005 .
URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PLCB1ID41742ch20p12.html>
2. Lo Vasco VR, Follo MY, Cocco L. Reply to Herens et al. Leukemia. 2006;20:522-3.
3. Follo MY, Bosi C, Finelli C, Fiume R, Faenza I, Ramazzotti G et al. Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLC β 1 gene expression in myelodysplastic syndrome. Int J Mol Med. 2006;18:267-271.
4. Follo MY, Mongiorgi S, Bosi C, Cappellini A, Finelli C, Chiarini F, et al. The Akt/mammalian Target of Rapamycin (mTOR) signal transduction pathway is activated in high risk myelodysplastic syndromes and influences cell survival and proliferation Cancer Res. 2007 (in press)

**Follo MY, Lo Vasco VR, Martinelli G, Palka G, Cocco L.
PLCB1 (phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)).
Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 2005 .**

URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PLCB1ID41742ch20p12.html>

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

[Home](#) [Genes](#) [Leukemias](#) [Solid Tumours](#) [Cancer-Prone](#) [Deep Insight](#) [Portal](#) [Teaching](#)

[X](#) [Y](#) [1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) [7](#) [8](#) [9](#) [10](#) [11](#) [12](#) [13](#) [14](#) [15](#) [16](#) [17](#) [18](#) [19](#) [20](#) [21](#) [22](#) [NA](#)

Gene Form for submission

Select all, copy and past this form in a ClarisWorks or Word file, save as a model, ... ready for use

CONTRIBUTORS Matilde Y. Follo;
 Vincenza Rita Lo Vasco;
 Giovanni Martinelli;
 Giandomenico Palka;
 Lucio Cocco

DATE December 23rd, 2005

CONTRIBUTORS

UPDATE

Identity ----->

GENE NAME phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)

ALIAS PLC-I; PI-PLC; PLC-154

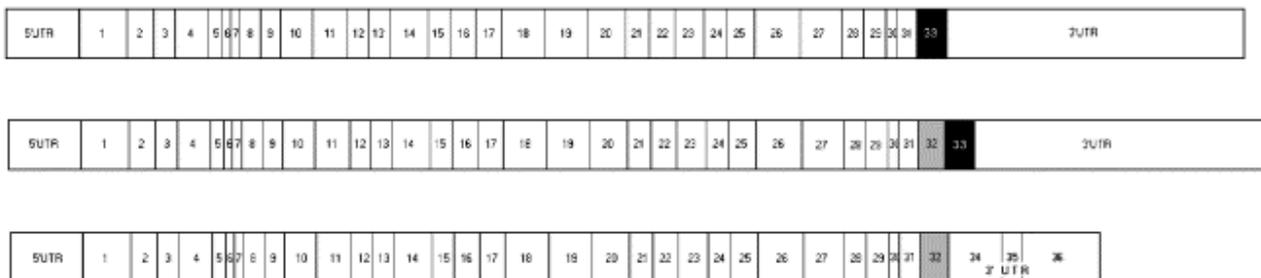
HUGO NAME [PLCB1](#)

LOCATION 20p12.3 (between the markers D20S917 and D20S177)

DNA ----->

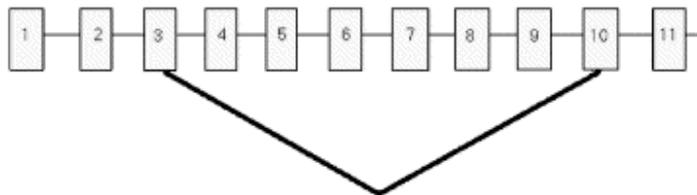
DIAGRAM (see below)

A



- 1. 7103 bp → PLCβ1a, 1216 aa
- 2. 7221 bp → PLCβ1b, 1173 aa
- 3. 5966 bp → PLCβ1b, 1173 aa

B



transcript 6606 bp → protein 968 aa

LEGEND DIAGRAM

Panel A: structure of PLCβ1a and PLCβ1b human cDNAs. Upper, PLCβ1a; middle, PLCβ1b; lower, PLCβ1b with different 3'-UTR.
 Panel B: structure of the splicing variant lacking exons 4-9.

DNA DESCRIPTION

33 small exons and introns spanning about 250 kbp.

TRANSCRIPTION

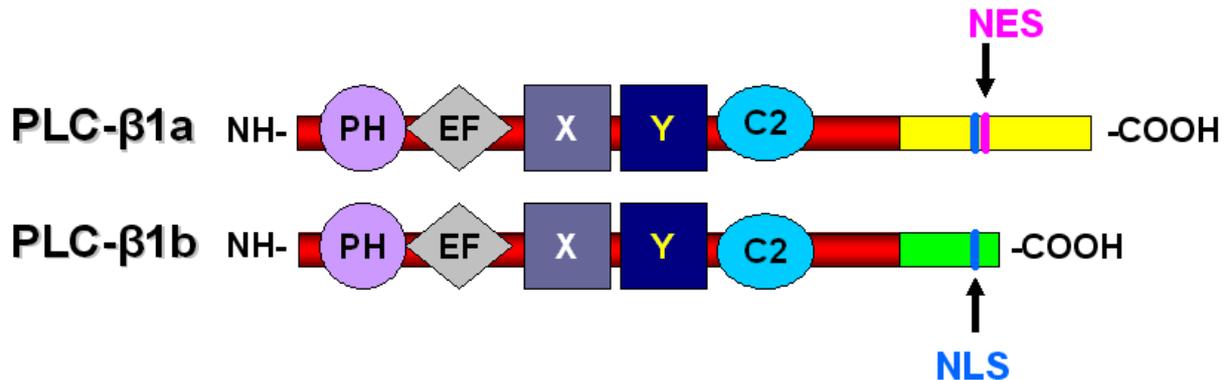
By alternative splicing at the 3-prime end the gene produces 2 variants: PLCβ1a (1.216 aminoacids, 6705 bp mRNA) and PLCβ1b (1.173 aminoacids, 6823 bp mRNA). Peruzzi et al. (2002) identified an additional exon at the 5-prime end, which gives a smaller isoform, and another PLCβ1b isoform, which is produced by using an alternative 3'-UTR.

PSEUDOGENE

No known pseudogenes.

Protein ----->

DIAGRAM



LEGEND DIAGRAM

PH = Pleckstrin Homology Domain;
EF = EF-Hand Domain;
X and Y = Catalytic Domain;
C2 = Calcium-binding Domain;
NLS = Nuclear Localisation Signal (common to both isoforms);
NES = Nuclear Export Signal

DESCRIPTION

PLC beta1 contains a PH-domain at the NH₂-terminus, which is present in many signalling proteins, that binds to polyphosphoinositides and to inositol phosphates. Two additional modules are also present: an EF-hand domain, located between the PH and X domains, and a C2 domain, which is sometimes represented as part of an extended Y domain.

EXPRESSION

PLC beta1 is ubiquitous at different levels of expression: higher signal intensities were observed in some CNS areas, such as the amygdala, caudate nucleus, and hippocampus, and PLCB1a appeared to be expressed at slightly higher levels in most tissues. PCR analysis of embryonic and adult rat tissues indicated restricted expression of both isoforms to embryonic and adult brain, with lower levels of expression in lung and testis.

LOCALISATION

By using confocal immunolocalization of endogenous or transfected epitope-tagged PLC beta1, for subcellular localisation it has been shown that PLCB1a is within

the cytoplasm and at the plasma membrane but localises also in the nucleus. PLCB1b is almost completely nuclear.

FUNCTION Phospholipase C-beta (PLC beta) catalyzes the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) from phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (IP2), a key step in the intracellular transduction of many extracellular signals. PLCB1 is one of several mammalian PLCB isoforms which differ in their function and expression patterns in vivo. PLC beta1 protein is present in the nucleus and is involved in the control of the cell cycle.

HOMOLOGY 96% with bovine PLC beta1; The amino acid sequences of PLC isozymes are relatively not conserved except for two regions, known as the X and Y domains that form the catalytic core which is 60% homologous among all mammalian isozymes.

Mutations ----->

NOTE Until now only deletions have been relevelated by using FISH analysis.

Implicated in ----->

NAME Myelodysplastic Syndrome

NOTE Transition from Myelodysplastic Syndrome to Acute Myeloid Leukemia

DISEASES In patients with normal GTG banding karyotype affected by Myelodysplastic Syndrome (MDS) (9 patients) and with Acute Myeloid Leukemia (AML) (6 patients), Lo Vasco et al. (2004) detected a monoallelic loss of the PLCB1 gene. All the MDS patients, even though with normal karyotype, belonged to the high-risk group as scored by IPSS and FAB classifications. Out of 9 MDS patients with normal karyotype 4 had monoallelic deletion of the PLC beta1 gene, and all 4 died within 1 to 6 months after developing AML, compared to survival of over 30 months in the 5 MDS patients without the deletion. Two of 6 AML patients with normal karyotype had a monoallelic deletion of the PLCB1 gene; these 2 patients had a reduced survival (1 to 12 months)

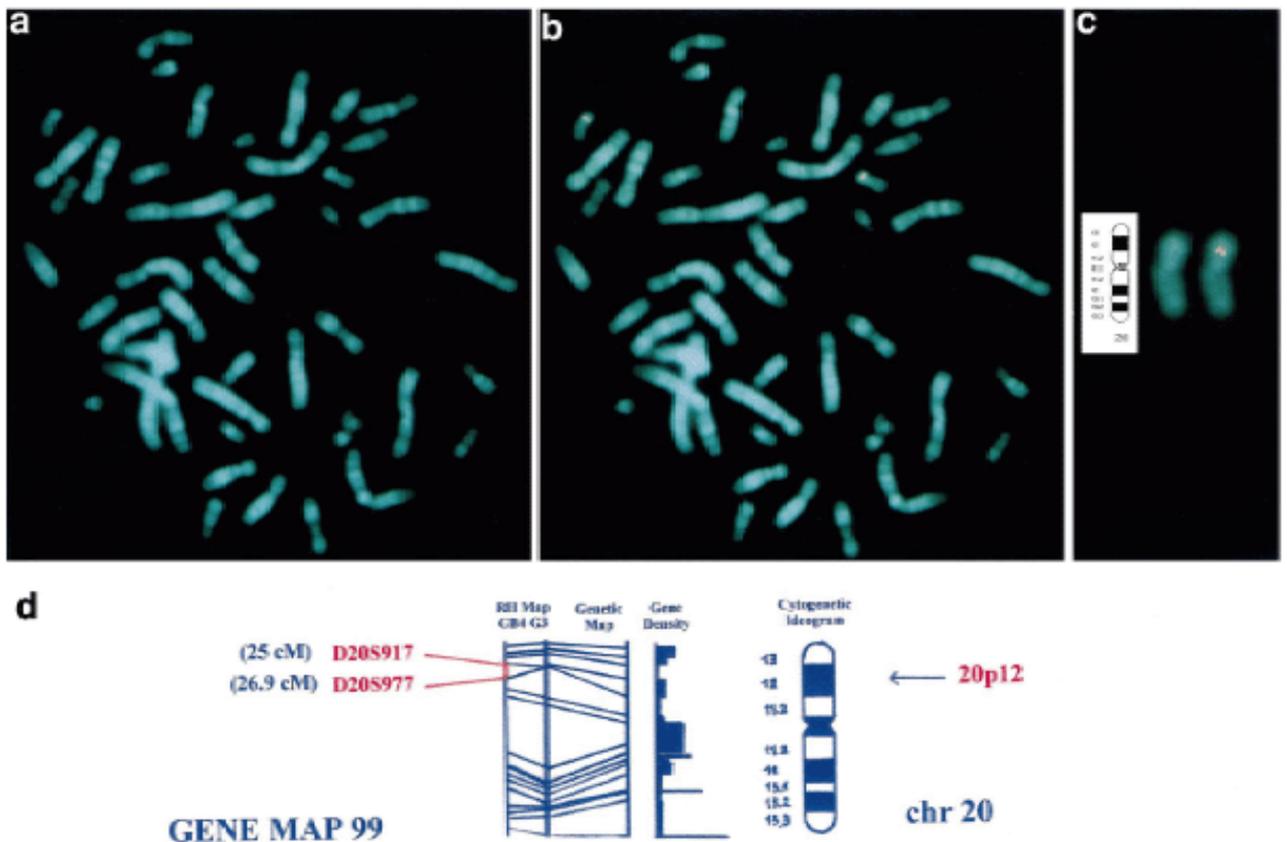
compared to the AML patients without the deletion (20 to 29 months). These evidences suggest a possible role for PLC beta1 in the progression of MDS to AML in high-risk patients.

PROGNOSIS

Worse in patients having the deletion of the PLC beta1 gene.

CYTOGENETICS

FISH performed using a 115.000 bp probe (PAC clone 881E24) spanning from exon 19 to 32 of the gene.



FISH analysis, using KIAA 0581, i.e., part of human PLC beta1 cDNA, of human metaphases showing signals on both chromosomes 20 at band p12. (a) Q-Like banding; (b) fluorescence signals detected by FISH; (c) a partial karyotype along with a human chromosome 20 ideogram. (d) A schematic representation of the 1.9 cM interval, flanked by microsatellite markers D20S917 and D20S977, to which human PLC beta1 maps.

ONCOGENESIS

PLC beta1 is a key player in the control of cell cycle, namely the physiological progression through the G1 phase, in that the nuclear PLC beta1 evoked signalling targets the cyclin D3/cdk4 complex which phosphorylates retinoblastoma protein (pRb) that in turn activates the transcription factor E2F-1. Possibly alterations of this pathway could be involved in malignancies.

External links (addresses are in the Database section of the Atlas; find the access No) -----
-->

Nomenclature

HUGO	PLCB1 AB011153
GDB	PLCB1 9955410
NCBI ENTREZ GENE	PLCB1 23236

Cards

GENECARD	PLCB1 GC20P008061
ENSEMBL	PLCB1 [TextView]
GENATLAS	PLCB1
GENELYNX	PLCB1 4255
eGENOME	PLCB1
euGENE	PLCB1 23236

Genomic and cartography

NCBI ENTREZ GENOME	PLCB1
NCBI Map View	PLCB1 [Genes Cyto]
NCBI Map View	PLCB1 [Genes Seq]
NCBI Map View	PLCB1 [EnsGenes]
OMIM	607120
GoldenPath	PLCB1 (hg17-May_2004)
GoldenPath	chr20:8061295-8813547+ [NM 015192] (hg17-May_2004)
GoldenPath	20p12.3 PLCB1a (hg17-May_2004)
GoldenPath	chr20:8061295-8813547+ [NM 182734] (hg17-May_2004)

GoldenPath [20p12.3 PLCB1b](#) (hg17-May_2004)
ENSEMBL [PLCB1- 20p12.3 \[CytoView\]](#)
Homologene [PLCB1 22876](#)
Human Genome Project [CHR 20](#) [Sanger]
Cancer Genome Anatomy Project [PLCB1](#) [CGAP-NCI]

Gene and Transcription

GENBANK [AL031683](#) [SRS] - [AL031683](#) [ENTREZ]
GENBANK [AL034551](#) [SRS] - [AL034551](#) [ENTREZ]
GENBANK [AL049593](#) [SRS] - [AL049593](#) [ENTREZ]
GENBANK [AL049632](#) [SRS] - [AL049632](#) [ENTREZ]
GENBANK [AL050315](#) [SRS] - [AL050315](#) [ENTREZ]
GENBANK [AL050323](#) [SRS] - [AL050323](#) [ENTREZ]
REFSEQ [NM_015192](#) [SRS] - [NM_015192](#) [ENTREZ]
REFSEQ [NM_182734](#) [SRS] - [NM_182734](#) [ENTREZ]
ACEVIEW [PLCB1](#) Aceview-NCBI
UNIGENE [Hs.431173](#) [NCBI]
Splice Variants [HS431173](#) [GeneNest] - [PLCB1 Hs431173](#) [SpliceNest]

Protein : pattern, domain, 3D structure

SwissProt/UniProtKB [Q9NQ66](#) [EXPASY]
InterPro [Q9NQ66](#) [EMBL-EBI]
Integr8 [Q9NQ66](#) [EMBL-EBI]
UniProt [Q9NQ66](#) [EMBL-EBI]
Prosit [C2 DOMAIN PS50004](#) [SRS]
Prosit [PI-PLC X DOMAIN PS50007](#) [SRS]
Prosit [PI-PLC Y DOMAIN PS50008](#) [SRS]

Prosite [PH DOMAIN PS50003](#) [SRS]
 Prosite [C2 DOMAIN PS50004](#) [EXPASY]
 Prosite [PI-PLC X DOMAIN PS50007](#) [EXPASY]
 Prosite [PI-PLC Y DOMAIN PS50008](#) [EXPASY]
 Prosite [PDOC50003 PH domain profile](#) [EXPASY]
 Interpro [IPR001192 PLC](#) [SRS] - [IPR001192 PLC](#) [EBI]
 Interpro [IPR000008 C2 DOMAIN](#) [SRS] - [IPR000008 PLCB1 C2 DOMAIN](#) [EBI]
 Interpro [IPR000909 X DOMAIN](#) [SRS] - [IPR000909 PLCB1 X DOMAIN](#) [EBI]
 Interpro [IPR001711 Y DOMAIN](#) [SRS] - [IPR001711 PLCB1 Y DOMAIN](#) [EBI]
 Interpro [IPR011993 PH DOMAIN](#) [SRS] - [IPR011993 PH DOMAIN](#) [EBI]
 Interpro [IPR011992 EF-Hand Type](#) [SRS] - [IPR011992 EF-Hand type](#) [EBI]
 CluStr [Q9NQ66](#) [EMBL-EBI]
 Pfam [Q9NQ66](#) [Sanger] - [Q9NQ66](#) [NCBI-CDD]
 Pfam [PF00168 C2](#) [Sanger]- [PF00168 C2](#) [NCBI-CDD]
 Pfam [PF00388 PI-PLC-X](#) [Sanger] - [PF00388 PI-PLC-X](#) [NCBI-CDD]
 Pfam [PF00387 PI-PLC-Y](#) [Sanger] - [PF00387 PI-PLC-Y](#) [NCBI-CDD]
 Smart [SM00239 C2 DOMAIN](#) [EMBL]
 Smart [SM00148 PLC-X](#) [EMBL]
 Smart [SM00149 PLC-Y](#) [EMBL]
 Smart [PH DOMAIN](#) [EMBL]
 Blocks [Q9NQ66](#)

Protein Interactions

HPRD [PLCB1](#)

BIND [PLCB1 - 295006 E2F4-PLCB1 Promoter](#)
BIND [300866 PLCB1-PARD3 - 300865 PLCB1-PARD6A](#)
BIND [123609 HNF1 alpha-PLCB1 - 179723 Tat-PLCB1](#)

Polymorphism : SNP, mutations, diseases

OMIM [607120](#)
SNP [23236](#) [dbSNP-NCBI]
SNP [NM 182734 GAI-predicted SNPs](#) [SNP-NCI] - [PLCB1](#) [SNP - CSHL]
SNP [CHR20](#) [SNP - NCI] - [CHR20 PLCB1](#) [HapMap]

General knowledge

Family Browser [NM 015192](#) [UCSC Family Browser]
SOURCE [NM 015192](#)
SOURCE [NM 182734](#)
SMD [Hs.431173](#)
SAGE [Hs.431173](#)
PubGene [PLCB1](#)

Functional Genomics - Metabolism

KEGG [PLCB1 23236](#)
KEGG [Inositol Phosphate Signalling](#)
KEGG [Calcium Signalling Pathway](#)
KEGG [Phosphatidylinositol Signaling System](#)
KEGG [Wnt Signaling Pathway](#)
KEGG [Gap Junction](#)
BIOCARTA [PLCB1 Pathways](#)
BIOCARTA [Phospholipase C Signaling Pathway](#)
Amigo [Component-Cytoplasm](#)

Amigo [Component-Nucleus](#)
Amigo [Function-Phosphoinositide Phospholipase C activity](#)
Amigo [Process-Regulation of progression through cell cycle](#)
Amigo [Process-Signal Transduction](#)

Comparative Cytogenetics

MGI [mouse PLCB1](#) [Genome Comparative Map]
MGI [mouse PLCB1](#) [Gene Expression]
Primate Research Center [macaque PLCB1](#)

Other databases

The Mammalian Gene Collection [PLCB1](#) [MGC cDNA clone]
Probes [RP5-881E24](#) [NCBI-Clone Registry]
Probes [PLCB1 Related clones \(RZPD - Berlin\)](#)

PubMed

PubMed [26 Pubmed reference\(s\) in Gene](#)
[BiblioGene - INIST](#)

References (PLEASE, see below and conform to the style) ----->

Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro.

Nagase T; Ishikawa K; Miyajima N; Tanaka A; Kotani H; Nomura N; Ohara O
DNA Res. 1998;5:31-39
Medline: [9628581](#)

Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLC-beta 1).

Caricasole A; Sala C; Roncarati R; Formenti E; Terstappen GC
Biochim. Biophys. Acta 2000;1517:63-72
Medline: [11118617](#)

Identification and chromosomal localisation by fluorescence in situ hybridisation of human gene of phosphoinositide-specific phospholipase C beta-1.

Peruzzi D; Calabrese G; Faenza I; Manzoli L; Matteucci A; Gianfrancesco F; Billi AM; Stuppia L; Palka G; Cocco L
Biochim. Biophys. Acta 2000;1484:175-182
Medline: [10760467](#)

Molecular characterization of the human PLC beta-1 gene

Peruzzi D; Aluigi M; Manzoli L; Billi AM; Di Giorgio FP; Morleo M; Martelli AM; Cocco L
Biochim. Biophys. Acta 2002;1584:46-54
Medline: [12213492](#)

Inositide-specific phospholipase c beta-1 gene deletion in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia.

Lo Vasco VR; Calabrese G; Manzoli L; Palka G; Spadano A; Morizio E; Guanciali-Franchi P; Fantasia D; Cocco L
Leukemia 2004;18:1122-1126
Medline: [15085153](#)

- Style to be used for References:

* classified by years, from the oldest to the most recent, and by alphabetical order within a year

* style:

Title.

Author1 AB, Author2 CD, Author3 E.

Journal Year; Vol: first page-last page. (add: REVIEW if it is)

Medline number

Example:

All teddy bears are gentle persons.

Paddington B, The Pooh W.

Int J Teddy Bears 2003; 12: 501-509. (REVIEW)

PMID 1642873591

- Please, send your contribution preferably by e-mail (Copy-and-past directly in the mail, and/or as an attachment, in ClarisWorks or in Word). Please, no printed version solely.
- Images should be sent by e-mail, preferably in BMP, GIF, JPG, otherwise PhotoShop; the desk may have problems with other formats.
- Please also, send copy of the main papers by traditional mail to speed up the refereeing process.

Send to:

Jean-Loup HURET,

Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, Editor,

UMR 8125 CNRS, Genetics, Dept Medical Information,

University Hospital, F-86021 Poitiers, FRANCE

tel +33 5 49 44 45 46 or +33 5 49 44 47 67

j.l.huret@chu-poitiers.fr AND Copy Carbone jlhuret@infobiogen.fr

Lo Vasco VR, Follo MY, Cocco L.

Reply to Herens et al.

Leukemia. 2006;20:522-3.

Correspondence

Reply to: Inositide-specific Phospholipase C β 1 gene deletion is a rare event in myelodysplastic syndromes, by Christian Herens et al.

Myelodysplastic syndromes are characterised by leukemic progression in about a third of cases and the progression is a major cause of death. Evolution constitutes a major problem and the outcome is highly variable especially in the low and intermediate risk categories, even though established with the refined International Prognostic Scoring System (IPSS), capable of a better predictivity respect to the French-American-British (FAB) classification. In those cases mostly normal or low-risk karyotypic changes are found¹. The high-risk group often shows progression to Acute Myeloid Leukemia (AML), being unresponsive to chemotherapy and AML is the cause of death, even though a number of patients do not progress to AML or are highly responsive to the treatment. The karyotype, carried out by GTG banding at diagnosis could be normal, but cryptic rearrangements and deletion could change the risk status in some of the patients².

The analysis we previously reported³ is based on a small number of patients (nine), with normal GTG banding karyotype and, as characterised by different meaning, i.e. FAB or IPSS, belonging to high risk group. The patients' age was ranging from 58 to 77 years and for different reasons they were supplied only with supportive treatment. Four patients showed the monoallelic deletion of inositide-specific phospholipase C β 1 (PI-PLC β 1) whilst five did not. The latter patients at the time of the publication of the report were still alive, ranging the survival after diagnosis from 30 to 32 months. The four patients affected by the deletion died within 1-6 months after diagnosis from AML evolution.

Indeed our data are strictly related to high risk patients, as evaluated by clinical meanings, i.e. FAB and IPSS, but bearing a normal karyotype, that from a cytogenetic point of view only, could be considered with favourable prognosis. We are keen to stress this point, even though in the Lo Vasco et al. paper³ the clinical features have not been fully explained. Even though the number of cases is small we reckon that in this peculiar type of patients the cryptic deletion of PI-PLC β 1 gene is not a rare event. Therefore in order to address this point as well as to further the understanding of the relationship between PI-PCLC β 1 gene deletion and MDS/AML progression we are currently evaluating a larger number of patients, coming from the Haematology Department of the University of Bologna, all with normal karyotype both at diagnosis and during disease progression, belonging to high risk, 13 patients (mean age 65

years), and low/intermediate risk, 10 patients (mean age 73 years), as established by IPSS and FAB as well. The rationale is based on the fact the data reported by Lo Vasco et al.³ might be of importance to identify a high grade MDS/AML population, with a common pathophysiology due to altered function of a key signalling intermediate in the control of cell cycle progression, i.e. PI-PCLC β 1. This also implies that the Lo Vasco paper³ is not aimed at all to change or challenge the value of the clinical parameters used for MDS classification, but is only aimed to give more insight in the intriguing and complex issue of MDS.

The FISH analysis carried out using the PI-PCLC β 1 probe (PAC clone HS881E24 from P de Jong RPCI-5 PAC library) confirms that low risk patients do not bear the deletion of PI-PCLC β 1 gene and did not evolved to AML even in the absence of supportive care. On the contrary, 4 high risk patients bear the deletion of PI-PCLC β 1 gene, are unresponsive to MDS treatment and evolved to AML. The remaining 9 high risk patients do not show the deletion of PI-PCLC β 1 gene and are responsive to MDS treatment.

Therefore we reckon that a key point is the disclosure of specific classes of patients and that the identification of a high grade MDS/AML population in patients bearing a normal GTG karyotype could be of importance in furthering the pathophysiology of MDS and of support for prognosis. In addition, this is also an answer to the Correspondence appeared recently in Leukemia⁴. To achieve this goal, we are extending the analysis on this type of patients by collaborating with British centres in order to accumulate as much data as possible, but we do also ask other groups to enter the fray. In addition, in replying to Herens et al.⁵, we add that we are keen to share our samples for further analysis. Moreover it should be interesting to know also in the group of patients examined by Herens et al. how many of them belong to the high risk group.

In conclusion, we do believe that a better and more comprehensive understanding of the alterations of signalling pathways in high grade MDS/AML is necessary, given that these metabolic events are fundamental for the control of cell cycle progression. Interestingly it has been very recently shown that frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high risk MDS patients takes place⁶ and this could be related to an increase of phosphatidylinositol-bisphosphate, the substrate of both PI-PCLC β 1 and of phosphatidylinositol 3-kinase, the enzyme that phosphorylates the Akt Kinase⁷. From a biological point of view it could be that the increased availability of phosphatidylinositol-bisphosphate, due to the monoallelic deletion of PI-PCLC β 1 gene and partial loss of function of the PI-PCLC β 1 itself in high risk MDS patients, could pave the way for the well known antiapoptotic pathway elicited by the phosphatidylinositol 3-

kinase/Akt Kinase cascade, which in turn could increase the survival of MDS blasts in the bone marrow.

REFERENCES

1. Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M., Fenau P., Morel P, Sanz G. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079–2088.
2. Cuneo A., Bigoni R., Cavazzini F., Bardi A., Roberti M.G., Agostini P., Tammiso E., Ciccone N., Mancini M., Nanni M., De Cuia R., Divona M., La Starza R., Crescenzi B., Testoni N., Rege Cambrin G., Mecucci C., Lo Coco F., Saglio G., Castoldi G. Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia* 2002 Sep;16(9):1745-51.
3. Lo Vasco V.R. , Calabrese G., Manzoli L., Palka G., Spadano A., Morizio E., Guanciali-Franchi P., Fantasia D., Cocco L. Inositide-specific phospholipase Cb1 gene deletion in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2004; 18(6):1122-6.
4. Verburgh E., Verhoef G., Vandenberghe P., Hagemeijer A.. Deletion of the inositide-specific phospholipase c beta1 gene is a rare event in myelodysplastic syndrome and thus of limited value to predict leukemic progression. *Leukemia* 2005 Nov;19(11):2011-3.
5. Herens C., Ketelsegers O., Tassin F., Hanssen S., Bours V. Inositide-specific phospholipase C b1 gene deletion is a rare event in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*...
6. Nyåkern M., Tazzari P.L., Finelli C., Bosi C., Follo M.Y., Grafone T., Piccaluga P.P., Martinelli G., Cocco L., Martelli A.M. Frequent elevation of Akt Kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia* 2005 (in press)
7. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003 Oct;4(4):257-62. Review.

Vincenza Rita Lo Vasco¹, Matilde Y. Follo² and Lucio Cocco²

¹ Department of Pharmacology of Natural Substances and General Physiology, University La Sapienza, Rome, Italy

² Cellular Signalling Laboratory, Department of Anatomical Sciences, University of Bologna, Italy

Corresponding author: Dr. Lucio COCCO

Professor and Head

Cellular Signalling Laboratory

Department of Anatomical Sciences

Via Irnerio, 48

40126 Bologna

Italy

Tel: +39 051 2091639

Fax: +39 051 251735

e-mail: lcocco@biocfarm.unibo.it

Follo MY, Bosi C, Finelli C, Fiume R, Faenza I, Ramazzotti G et al.

**Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLC β 1 gene
expression in myelodysplastic syndrome.**

Int J Mol Med. 2006;18:267-271

Real-Time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLC β 1 gene expression in myelodysplastic syndrome

Matilde Y. Follo¹, Costanza Bosi², Carlo Finelli², Roberta Fiume¹, Irene Faenza¹, Giulia Ramazzotti¹, Gian Carlo Gaboardi¹, Lucia Manzoli¹ and Lucio Cocco^{1,*}

¹*Department of Anatomical Sciences, Cellular Signalling Laboratory, University of Bologna, via Irnerio 48, 40126 Bologna, Italy;* ²*Institute of Hematology and Medical Oncology “L. e A. Seràgnoli”, University of Bologna, Bologna, Italy*

***Corresponding author:** Dr. Lucio Cocco, Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore, Sezione di Anatomia Umana, Cell Signalling Laboratory, Università di Bologna, 40126 Bologna, Italy. Phone: +39-0512091639; Fax: +39-051251735; e-mail: lcocco@biocfarm.unibo.it

Key words: myelodysplastic syndrome, inositide-specific phospholipase C β 1, real-time polymerase chain reaction, chromosome

Running Title: PI-PLC β 1 and myelodysplastic syndrome

ABSTRACT

Phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) β 1 is a key enzyme in nuclear signal transduction, and it is involved in many cellular processes, such as proliferation and differentiation. In particular, the involvement of the PI-PLC β 1 gene in erythroid differentiation lead us to investigate this gene in patients affected by high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). By using fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis, we have previously evidenced that, in MDS patients with normal GTG banding and a fatal outcome, the PI-PLC β 1 gene undergoes a monoallelic and interstitial deletion. Real-Time PCR is characterized by high sensitivity, excellent precision and large dynamic range, and has become the method of choice for quantitative gene expression measurements. In the present study, we have performed a relative quantification real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis on all of the MDS patients tested for FISH analysis. Furthermore, we have evaluated the expression of the PI-PLC β 1 gene on healthy donors and the HL60 cell line, which is useful for testing the accuracy of the technology because of its low expression of PI-PLC β 1. To analyze and quantify the levels of the two different splicing variants of PI-PLC β 1 gene (1a and 1b), we have used a TaqMan isoform specific probe. We have seen that all of the MDS patients have higher levels of the PI-PLC β 1 mRNA compared to the HL60 cell line as expected, but lower levels compared to the healthy donors. Furthermore, MDS blasts always express higher levels of PI-PLC β 1b mRNA compared to PI-PLC β 1a mRNA.

Our data support the contention that the deletion of PI-PLC β 1 gene is indeed responsible for a reduced expression of the enzyme. In addition, the splicing isoform 1b, which is only nuclear, seems to be somehow partially preserved compared to the 1a isoform which is nuclear and cytoplasmatic, hinting at a possible imbalance of the nuclear versus cytoplasmatic PI-PLC signaling which, in turn, could affect the cell cycle progression of MDS blasts.

INTRODUCTION

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of bone marrow disorders characterized by a defect in the differentiation of the hematopoietic stem cell that causes anemia, neutropenia, bleeding problems and infections. MDS blasts are histologically analyzed and divided according to the F.A.B. (French-American-British) classification, based on the number and type of blasts present in a bone marrow aspirate and biopsy. The F.A.B. classification is useful since MDS patients can be generally divided into two major groups: patients at high and at low risk of developing acute myeloid leukemia (AML). The evolution into AML involves ~30% of patients affected by MDS, and these patients usually have a worse clinical outcome. Even if ~70% of patients affected by MDS are considered at low risk, ~25-30% of may develop AML. In addition, the prognosis of MDS patients is based on their karyotype. There are some recurrent chromosomal defects, such as trisomy of chromosome 8 or loss of chromosome 5q, that are found in patients at major risk of developing AML, compared to patients with a normal GTG banding that are considered at minor risk (1). Phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) β 1 is a key enzyme for the nuclear signaling pathway, since it is involved in many cellular processes, such as proliferation and differentiation. It has been demonstrated that PI-PLC β 1 is down-regulated during the differentiation of Friend erythroleukemia cells (2), suggesting that this enzyme could affect the generation of MDS blasts (3). By using fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis, the PI-PLC β 1 gene has been mapped on chromosome 20p12 (4). Using the same type of probe, our group has recently studied a small number of high-risk MDS patients. Our results showed that patients bearing a monoallelic deletion of PI-PLC β 1 gene had a worse clinical outcome than patients having both alleles. To evaluate whether the disease was accompanied by reduced expression of PI-PLC β 1 mRNA, the level of PI-PLC β 1 mRNA was quantified in the same patients analyzed by FISH. The alternative splicing of PI-PLC β 1 produces two

transcripts (1a and 1b) that differ for the presence, in the PI-PLC β 1b isoform, of a small exon containing a stop codon that causes the production of a shorter protein (5,6). Compared to the healthy donors, MDS patients have a lower expression of both PI-PLC β 1a and PI-PLC β 1b. In all of the patients examined, the expression of both PI-PLC β 1 isoforms is higher as compared to HL60 cell line. Furthermore, MDS blasts express higher levels of PI-PLC β 1b mRNA as compared to PI-PLC β 1a mRNA.

MATERIALS AND METHODS

Patients and cell lines. Bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples were obtained from 8 patients with MDS with normal karyotype and from 10 healthy donors who had given informed consent in accordance with institutional guidelines. All the samples were from the Institute of Hematology and Medical Oncology “L. e A. Seràgnoli” of the General Hospital of Bologna. In all 8 subjects participating in this study, the diagnosis was defined according to the French American British (F.A.B.) classification, while the International Prognostic Scoring System (IPSS) was used to assess the presence of high-risk MDS (7). For *in vitro* experiments, bone marrow mononuclear cells (BMMCs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) density-gradient centrifugation. All analyses were performed on samples from patients at the time of diagnosis; therefore, they were not already subjected to any MDS treatment, which might affect the expression of PI-PLC β 1.

HL60 cells (obtained from the American Type Culture Collection-CCL 240) were routinely maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum at an optimal cell density of $3-8 \times 10^5$ cells/ml.

FISH analysis. Cytogenetic investigations were carried out on bone marrow cells stimulated for 72h with phytohemagglutinin (PHA). FISH analysis was performed according to Lo Vasco *et al* (8) by using a specific probe for the gene of PI-PLC β 1 (PAC clone HS881E24 from P de Jong RPCI-5 PAC library). As a control, we used a probe for the chromosome 20p arm subtelomeric region (Cytocell/Celbio, Italy) and one for PI-PLC β 4 (cDNA probe kindly provided by Dr Sue Goo Rhee, NIH, Bethesda, MD, USA). FISH analysis for PI-PLC β 1 and PI-PLC β 4 were performed according to standard methods; the DNA probe was biotin-labelled by nick translation and detected with Cy3-conjugated streptavidin (Sigma-Aldrich). FISH analysis for the subtelomeric region was performed according to the manufacturer's data. The images were acquired by using a Nikon Eclipse 800 fluorescence microscope and the Genikon system.

RNA extraction and retro-transcription. Total cellular RNA was extracted from blasts and the HL60 cell line by using the denaturing guanidinium isothiocyanate method (Rneasy mini Kit; Qiagen Ltd.) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was eliminated by RNase-free DNase I digestion (Qiagen Ltd.) during the isolation procedure. cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA using 200U of M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μ g of oligodT primers, 25U ribonuclease inhibitor, 10 mM of each dNTP for 1 hour at 42°C.

Real-Time PCR. The expression of PI-PLC β 1 gene was determined using a TaqMan based Real-Time PCR method. To analyze and quantify the levels of the two different isoforms of PI-PLC β 1 gene (1a and 1b), we used a TaqMan isoform-specific probe (Assay n° Hs01001939_m1 and Hs01008373_m1, Applied Biosystems). To establish which was the better housekeeping gene, we performed a reaction with the TaqMan human endogenous control plate according to the manufacturer's protocols and, as indicated by the plate, the

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeper gene (Assay n°Hs99999905_m1, Applied Biosystems) was chosen as the reference. The HL60 cell line was used as another control for the Real-Time PCR reaction, since this cell line has a very low expression of PI-PLC β 1 (9).

Amplification was performed using a total reaction volume of 25 μ L in a MicroAmp Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems). Real-Time PCR reactions were carried out with TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) containing the primers and probes. Reactions were run on the ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems) with the following thermal conditions: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

Quantification analysis was performed using the $\Delta\Delta$ Ct method and statistically analyzed by GraphPad Prism software(v. 3.0).

RESULTS

Patients characteristics. Bone marrow mononuclear cell (BMMC) and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) fractions from 8 patients with normal karyotype and diagnosed with MDS were examined. Patient demographics and disease characteristics are summarized in Table I. The median age was 67.6 years (range, 61-72 years). MDS patients were classified according to the International Prognostic Score System (IPSS).

Table II refers to FISH analysis, which was performed on each MDS patient to determine the presence of PI-PLC β 1, PI-PLC β 4 and 20p subtelomeric region. In particular, 3/8 high-risk MDS patients (38.5%) showed monoallelic deletion of PI-PLC β 1 gene, while both PI-PLC β 4 and the 20p subtelomeric region were normal in all patients.

Reference genes for Real-Time PCR. The internal reference was chosen according to the results obtained from the TaqMan human endogenous plate control (Fig. 1), where 11 commonly used housekeeping genes are investigated. The analysis was performed on isolated blasts from three healthy donors (Samples A,B,C) and one patient (Sample D). As Fig. 1 shows, the range of expression stability of these genes was, from the most stable to the least stable: B2M (β -2-microglobulin), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TBP (TATA-binding protein), PO (acidic ribosomal protein), TfR (transferrin receptor), HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase), BA (β -actin), PGK (phosphoglycerokinase), GUS (β -glucuronidase), CYC (cyclophilin), 18S rRNA.

The two genes showing the least variance and which could, therefore, be used as internal reference were B2M and GAPDH. Even though the B2M gene has been used as an internal reference gene for real-time PCR reactions in peripheral blood cells (10), we decided to use GAPDH, because it is unrelated to the hematopoietic system.

PLC β 1a and PLC β 1b mRNA expression in healthy donors and the HL60 cell line. mRNAs from 10 healthy donors' BMNC and PBMC fractions were extracted and retro-transcribed. Then, we performed a real-time PCR reaction in order to determine the absolute amount of PI-PLC β 1a and PI-PLC β 1b transcript in these samples (data not shown). The cDNAs were subsequently mixed considering the results obtained from this analysis and used as the calibrator for the MDS patients analysis.

The HL60 cell line was used as another internal control for the method, since this cell line has a very low expression of the PI-PLC β 1 transcripts. In fact, by using the PLC β 1 amount of the healthy donors as the calibrator (100%), the HL60 cell line had the lowest expression of both the PI-PLC β 1 isoforms, showing a decrease of 99% for the PI-PLC β 1a isoform and a PI-PLC β 1b mRNA level of 6% compared to the healthy donors (Figs. 2 and 3).

PLCβ1a and PLCβ1b mRNA expression in MDS patients. The results obtained with the PI-PLCβ1a probe show that high-risk MDS patients have a lower level of the transcript compared to the healthy donors (Fig. 2). Considering a value of 100% for healthy donors, the relative amount of PLCβ1a mRNA in all of the patients is comprised between 2 and 35%, as shown in Fig.2 .

Similarly, with the PI-PLCβ1b probe, most of the high-risk MDS patients (90%) demonstrated a lower expression of the PI-PLCβ1b mRNA (Fig. 3). In this case, the samples show more variability in PI-PLCβ1b relative amount, since the mRNA levels vary from 5 to 94% (healthy donors=100%).

By comparing the two assays results, we saw that all of the patients show an increase in the relative amount of the PI-PLCβ1b transcript as compared to the PI-PLCβ1a isoform (Fig. 4).

DISCUSSION

Recently we have seen that patients affected by myelodysplastic syndrome and bearing a monoallelic deletion in the PI-PLCβ1 gene have a worse clinical outcome than patients with both alleles (8). Even though this feature applies to high-risk and not to all MDS patients, it is interesting because of the fact that the PI-PLCβ4 gene, which is located closely to PI-PLCβ1, is unaffected, showing that we are facing a cryptic deletion in patients with a normal GTG banding karyotype (8, 11). Thus, we decided to analyze further the molecular biology of this deletion.

To determine whether the monoallelic deletion of the PI-PLC β 1 gene results in reduced gene expression, we investigated the PI-PLC β 1 mRNA levels in these patients. The relative expression of the PI-PLC β 1 gene was studied by means of the real-time PCR. The study involved both healthy donors and patients affected by myelodysplastic syndrome and formerly analyzed by FISH. The blast cells were from MDS patients (with a normal karyotype) at high risk of evolution in AML, all at the time of MDS diagnosis (Table I). We used specific probes for the two transcripts of the PI-PLC β 1 gene (1a and 1b). The analysis was performed through a semi-quantitative method, with the average transcript amount of healthy donors as a calibrator. The GAPDH gene was the internal reference for each sample, useful for determining any sample-to-sample variation of the quantity and quality of RNA and differences in efficiency of reverse transcription and PCR reactions.

Our results show that the expression of PI-PLC β 1 mRNA is altered in patients affected by MDS at high risk of evolution into AML. In fact, all of the patients we analyzed showed a decrease in the amount of PI-PLC β 1a. PI-PLC β 1b expression was also affected since, in almost all the high-risk patients, we found a lower level of this isoform. Collectively, our data suggest that a reduced expression of PI-PLC β 1 mRNA is frequently present in patients affected by high-risk MDS.

Interestingly, MDS cells always express higher levels of PI-PLC β 1b mRNA compared to PI-PLC β 1a mRNA. This difference could reflect a specific effect of the different localization of these two mRNA transcripts. In fact, splicing isoform 1a demonstrates both nuclear and cytoplasmatic localization, while splicing isoform 1b is localized only to the nucleus. The same difference was found between the amount of the two isoforms in the healthy donors.

The altered expression of nuclear PI-PLC β 1 mRNA could be related to an altered expression of the protein and, as a consequence, it could alter the nuclear lipid signaling

pathway, which is involved in different processes, such as cell proliferation and differentiation. In particular, as reported by Faenza *et al* (12), nuclear PI-PLC β 1 can induce cell cycle progression in Friend erythroleukemia cells. As a consequence, cyclin D3, along with its kinase (cdk4), is activated in a specific manner. Moreover, these authors showed that retinoblastoma protein is phosphorylated and E2F-1 transcription factor is activated, indicating a direct effect of nuclear PLC β 1 signaling in G1 progression by means of a specific target, i.e. cyclin D3/cdk4. In conclusion, these findings could have an important meaning for high-risk MDS patients, since the altered expression of nuclear PI-PLC β 1 could be involved in a dysregulation of the cell cycle and also have important effects on cell apoptosis pathways.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by AIRC, Italian Ministry of University and Research FIRB and Cofin grants and CARISBO Foundation.

REFERENCES

1. Mori N, Morosetti R, Hoflehner E, Lubbert M, Mizoguchi H and Koeffler HP: Allelic loss in the progression of myelodysplastic syndrome. *Cancer Res* 60(11): 3039-3042, 2000.
2. Martelli AM, Billi AM, Gilmour RS, Neri LM, Manzoli L, Ognibene A and Cocco L: Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend cells: phospholipase C beta down-regulation is related to cell differentiation. *Cancer Res* 54(10): 2536-2540, 1994.
3. Cocco L, Manzoli L, Palka G and Martelli AM: Nuclear phospholipase C beta1, regulation of the cell cycle and progression of acute myeloid leukemia. *Adv Enzyme Regul* 45: 126-135, 2005.
4. Peruzzi D, Calabrese G, Faenza I, Manzoli L, Matteucci A, Gianfrancesco F, Billi AM, Stuppia L, Palka G and Cocco L: Identification and chromosomal localisation by fluorescence in situ hybridisation of human gene of phosphoinositide-specific phospholipase C beta(1). *Biochim Biophys Acta* 1484(2-3): 175-182, 2000.
5. Bahk YY, Song H, Baek SH, Park BY, Kim H, Ryu SH, and Suh PG: Localization of two forms of phospholipase C-beta1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1389(1): 76-80, 1998.
6. Cocco L, Manzoli L, Barnabei O, Gilmour RS and Martelli AM: Re-examination of the significance of nuclear localization of PLCbeta1 in the likelihood of its involvement in neoplastic cell growth. *Adv Enzyme Regul* 43: 1-13, 2003.

7. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, and Bennett J: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89: 2079-2088, 1997.
8. Lo Vasco VR, Calabrese G, Manzoli L, Palka G, Spadano A, Morizio E, Guanciali-Franchi P, Fantasia D and Cocco L: Inositide-specific phospholipase c beta1 gene deletion in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18(6): 1122-1126, 2004.
9. Lukinovic-Skudar V, Donlagic L, Banfic H and Visnjic D: Nuclear phospholipase C-beta1b activation during G2/M and late G1 phase in nocodazole-synchronized HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1733(2-3): 148-156, 2005.
10. Oselin K, Mrozikiewicz PM, Pahkla R and Roots I: Quantitative determination of the human MRP1 and MRP2 mRNA expression in FACS-sorted peripheral blood CD4+, CD8+, CD19+, and CD56+ cells. *Eur J Haematol* 71(2): 119-123, 2003.
11. Lo Vasco VR, Follo MY and Cocco L: Reply to Herens et al. *Leukemia* 20(3): 522-3, 2006.
12. Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, Vitale M, Castorina S, Suh PG and Cocco L: A role for nuclear phospholipase Cbeta 1 in cell cycle control. *J Biol Chem* 275(39): 30520-30524, 2000.

Table I. Patients characteristics

Characteristics	
General	
No. patients	8
Male/female ratio	5/3
Median age, years (range)	67.6 (61-72)
Category	
High-risk MDS ^a	8
Cytogenetics	
Diploid	8

^aClassified according to the IPSS

Table II. FISH analysis in high-risk MDS patients

Patients	Age	Diagnosis	Karyotype	Sample Type	PLCβ1	PLCβ4	tel20p
A	70	High Risk MDS	46,XX	Bone Marrow	+/-	+/+	+/+
B	68	High Risk MDS	46,XY	Bone Marrow	+/+	+/+	+/+
C	65	High Risk MDS	46,XX	Bone Marrow	+/+	+/+	+/+
D	72	High Risk MDS	46,XY	Bone Marrow	+/-	+/+	+/+
E	71	High Risk MDS	46,XX	Bone Marrow	+/+	+/+	+/+
F	64	High Risk MDS	46,XY	Peripheral Blood	+/-	+/+	+/+
G	70	High Risk MDS	46,XY	Peripheral Blood	+/+	+/+	+/+
H	61	High Risk MDS	46,XY	Peripheral Blood	+/+	+/+	+/+

FIGURE AND LEGENDS

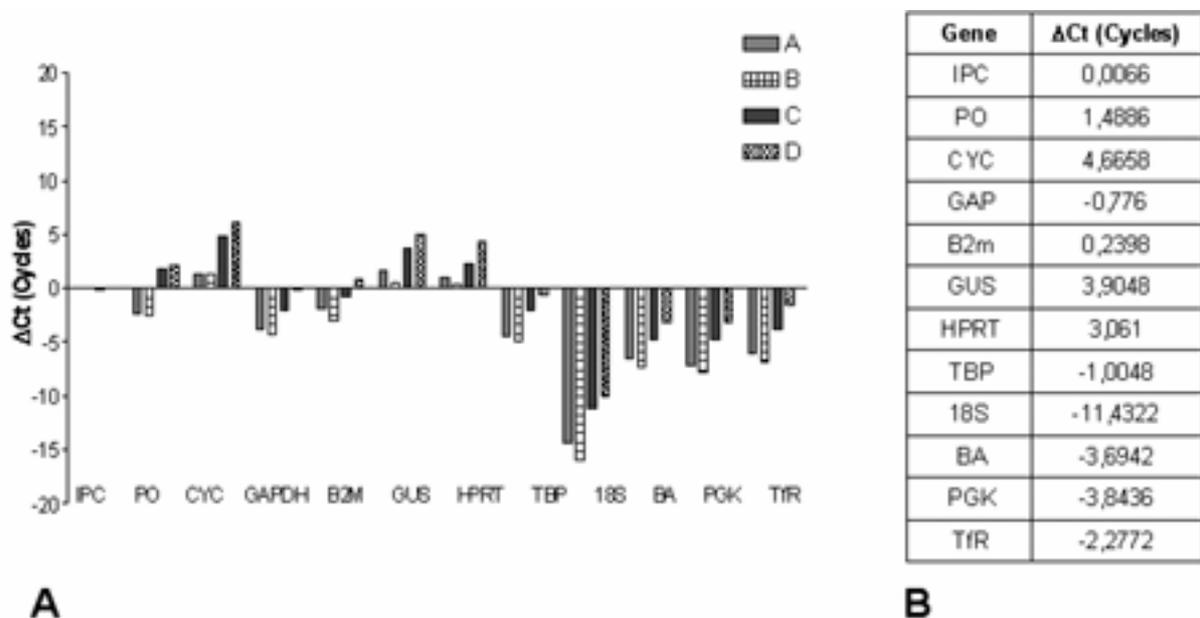


Figure 1. TaqMan endogenous plate control analysis in healthy donors and high-risk MDS patients. The analysis was performed in three healthy donors (Samples A, B, C) and a high-risk MDS patient (Sample D). (A) Bars represent the difference for each gene compared to the internal positive control (IPC) in all of the samples examined (A-D). (B) The table represents the mean values of the difference for each gene compared to the IPC. The 11 genes analyzed were, from the most stable to the least stable, as compared to the Internal Positive Control (IPC): B2M (β -2-microglobulin), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TBP (TATA-binding protein), PO (acidic ribosomal protein), TfR (transferrin receptor), HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase), BA (β -actin), PGK (phosphoglycerokinase), GUS (β -glucuronidase), CYC (cyclophilin), 18S rRNA.

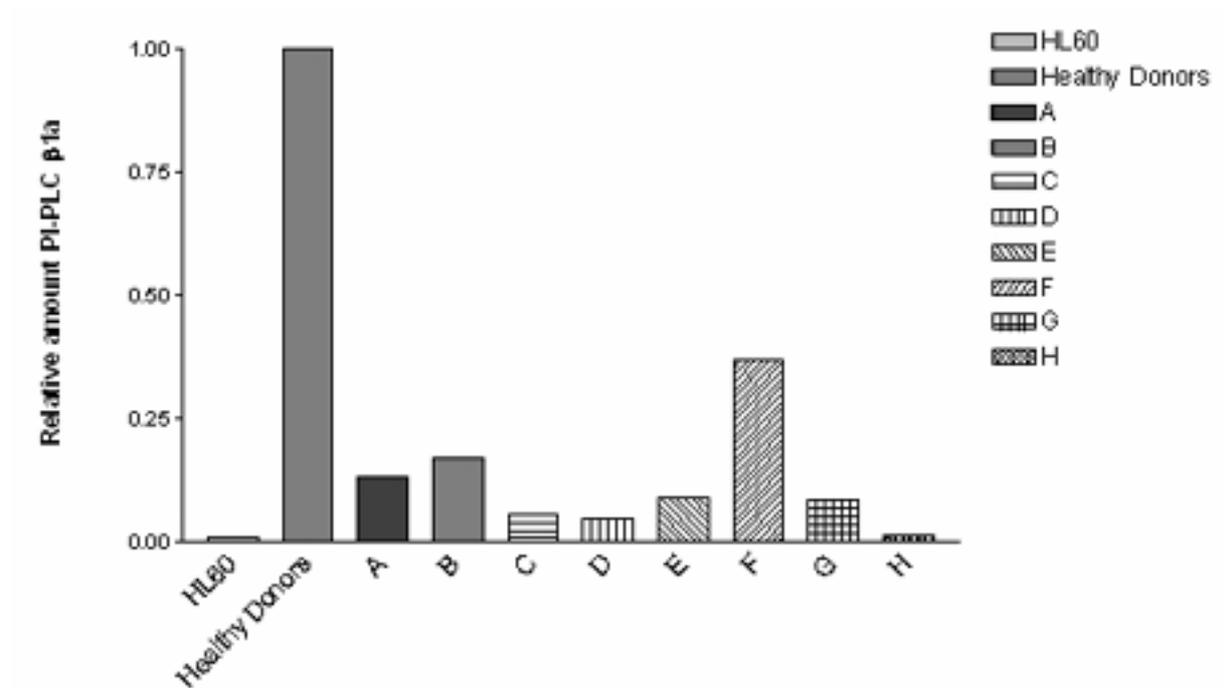


Figure 2. Relative quantification of PI-PLC β 1a mRNA in high-risk MDS patients. All of the MDS patients (A-H) show significant reduced gene expression compared to healthy donors and a higher expression compared to the HL60 cell line. GAPDH was used as a housekeeping gene for all the samples. The fold difference evaluated by $\Delta\Delta C_t$ method was calculated from three different experiments and statistically analyzed by a Dunnet test after ANOVA. All the relative amounts were statistically different ($p < 0.01$ vs. healthy donors).

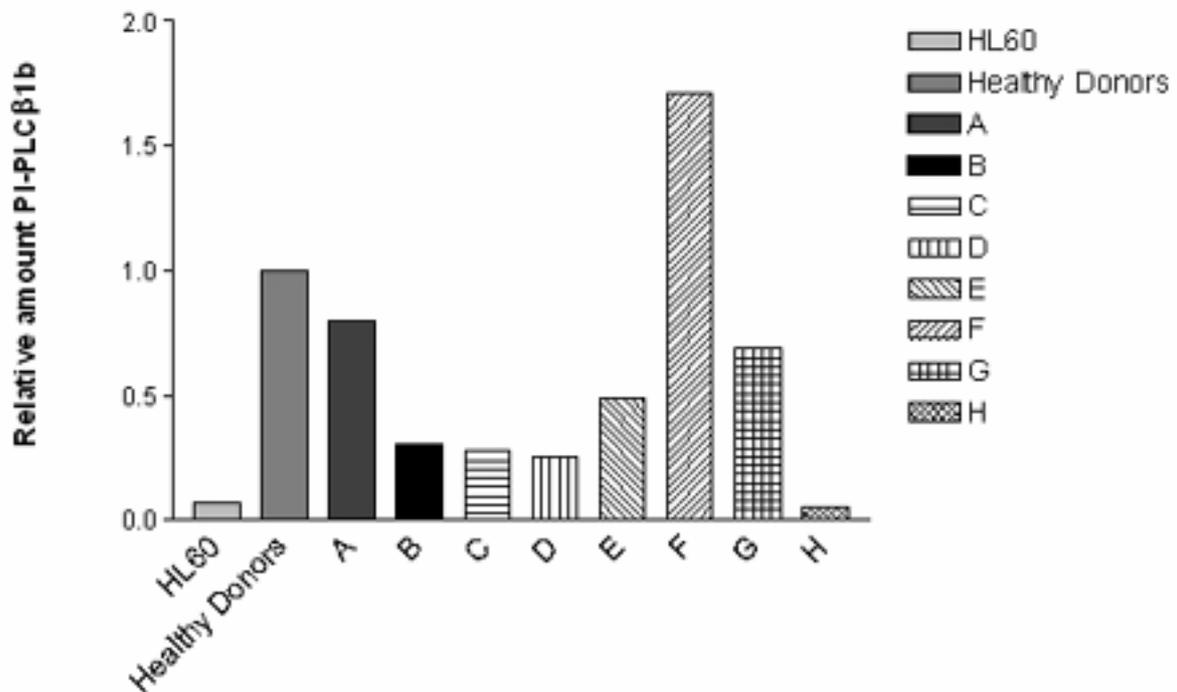


Figure 3. Relative quantification of PI-PLCβ1b mRNA in high-risk MDS patients. All of the MDS patients (A-H) showed significant altered gene expression compared to healthy donors and a higher expression compared to the HL60 cell line. The high-risk MDS patients had a lower amount of PI-PLCβ1b mRNA, except for patient F, who showed a higher amount of mRNA. GAPDH was used as a housekeeping gene for all of the samples. The fold difference evaluated by $\Delta\Delta C_t$ method was calculated from three different experiments and statistically analyzed by a Dunnett test after ANOVA. All the relative amounts were statistically different ($p < 0.01$ vs. healthy donors).

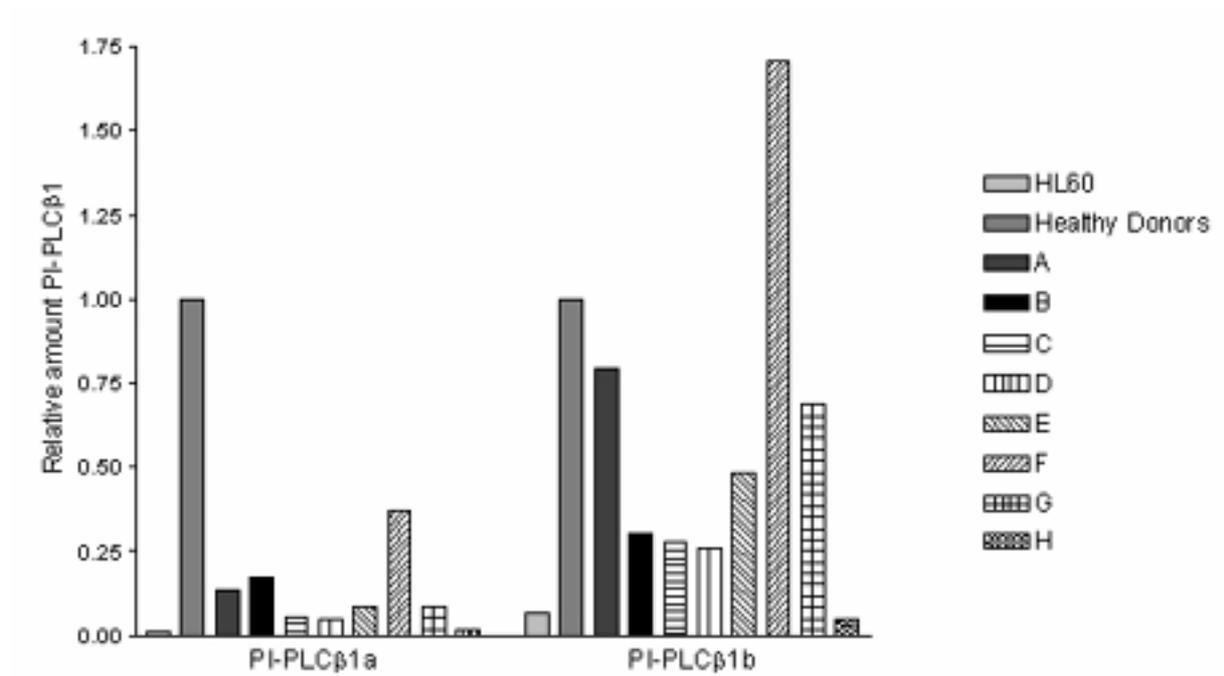


Figure 4. Comparison of the relative amount of PI-PLCβ1a and PI-PLCβ1b mRNA in high-risk MDS patients. PI-PLCβ1a and PI-PLCβ1b mRNA relative amount in high-risk MDS patients. The PI-PLCβ1b expression is always higher, compared to that of the PI-PLCβ1a isoform.

**Follo MY, Mongiorgi S, Bosi C, Cappellini A, Finelli C, Chiarini F, et al.
The Akt/mammalian Target of Rapamycin (mTOR) signal transduction
pathway is activated in high risk myelodysplastic syndromes and influences
cell survival and proliferation
Cancer Res. 2007 (in press)**

The Akt/mammalian Target of Rapamycin (mTOR) signal transduction pathway is activated in high risk myelodysplastic syndromes and influences cell survival and proliferation

Matilde Y. Follo¹, Sara Mongiorgi¹, Costanza Bosi², Alessandra Cappellini³, Carlo Finelli², Francesca Chiarini¹, Veronica Papa¹, Massimo Libra⁴, Giovanni Martinelli², Lucio Cocco¹, Alberto M. Martelli^{1,5}

¹*Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore, Sezione di Anatomia, Cell Signaling Laboratory, Università di Bologna, Bologna, Italy;*

²*Istituto di Ematologia ed Oncologia Medica "L. e A. Seràgnoli", Università di Bologna, Bologna, Italy;* ³*Dipartimento di Scienze Motorie e della Salute, Sezione di Anatomia, Università di Cassino, Cassino, Italy,* ⁴*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Catania, Catania, Italy;* ⁵*Istituto di Genetica Molecolare del C.N.R., c/o I.O.R., Bologna, Italy.*

Running title: Akt/mTOR activation in high risk MDS patients

Key words: Akt; mTOR; rapamycin; apoptosis; myelodysplastic syndrome

Acknowledgments: This work was supported by grants from: CARISBO Foundation, Associazione Italiana Ricerca sul Cancro, Italian MIUR PRIN 2005.

Correspondence: A. M. Martelli, MD, Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore, Università di Bologna, via Irnerio 48, 40126 Bologna, Italy. Phone: +39-051-2091580; Fax: +39-051-2091695; e-mail: amartell@biocfarm.unibo.it

ABSTRACT

The Akt/mTOR signaling pathway is important for both cell growth and survival. In particular, an impaired regulation of the Akt/mTOR axis has been strongly implicated in mechanisms related to neoplastic transformation, through enhancement of cell proliferation and survival. Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of heterogeneous hematopoietic stem cell disorders characterized by ineffective hematopoiesis and by a high risk of evolution into acute myeloid leukemia (AML). It is still unclear what is the pathogenesis of the MDS evolution into AML, although some recent studies indicate that aberrant activation of survival signaling pathways could be involved. In this investigation, performed by means of immunofluorescent staining, we report an activation of the Akt/mTOR pathway in high risk MDS patients. Interestingly, not only mTOR was activated, but also its downstream targets, 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K). Treatment with the selective mTOR inhibitor, rapamycin, significantly increased apoptotic cell death of CD33⁺ (but not CD33⁻) cells from high risk MDS patients. Rapamycin was ineffective in cells from healthy donors or low risk MDS. Moreover, incubation of high risk MDS patient CD34⁺ cells with rapamycin, decreased the *in vitro* clonogenic capability of these cells. In contrast, the phosphoinositide 3 kinase inhibitor LY294002, did not significantly affect the clonogenic activity of high risk MDS cells. Taken together, our results indicate that the Akt/mTOR pathway is critical for cell survival and proliferation in high risk MDS patients. Therefore, this signaling network could become an interesting therapeutic target for treating more advanced MDS cases.

INTRODUCTION

The phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/Akt signaling pathway is involved in many different cellular processes, including proliferation, differentiation, and apoptosis (1-2). Akt (also known as protein kinase B, PKB) is a 57-kDa Ser/Thr protein kinase which is activated through a double phosphorylation mechanism. Firstly, Akt is recruited to the plasma membrane by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, which is synthesized by PI3K, and is then phosphorylated by the phosphoinositide-dependent protein kinase 1 at the Thr308 of the activation loop. Subsequently, a still unidentified kinase phosphorylates Akt at the Ser473 in the C-terminus regulatory region domain.

An impaired regulation of the PI3K/Akt axis has been strongly implicated in carcinogenesis (3-7). In particular, the activation of the PI3K/Akt survival pathway is often associated with hematological malignancies (8-14), including acute and chronic human leukemias.

One of the downstream targets of Akt is represented by the mTOR, a highly conserved Ser/Thr protein kinase that is essential for the regulation of cell growth and proliferation, by controlling these processes at the translational level (15) and by acting on the cell cycle progression. Indeed, mTOR is capable of regulating the synthesis of key proteins such as retinoblastoma protein, p27Kip1, cyclin D1, c-myc, or STAT-3. Furthermore, recent studies have demonstrated that mTOR is also involved in cell death, so that a deregulation of this kinase could lead to the activation of anti-apoptotic mechanisms (16,17).

Akt-mediated regulation of mTOR activity is a complex multi-step phenomenon (9). Akt inhibits tuberous sclerosis 2 (TSC2 or hamartin) function through direct phosphorylation. TSC2 is a GTPase-activating protein (GAP) that functions in association with the putative TSC1 (or tuberin) to inactivate the small G protein Rheb (Ras homolog enriched in brain). TSC2 phosphorylation by Akt represses GAP activity of the TSC1/TSC2 complex, allowing Rheb to accumulate in a GTP-bound state. Rheb-GTP then activates, through a mechanism not yet elucidated, the protein kinase activity of mTOR when complexed with the Raptor (Regulatory associated protein of mTOR)

adaptor protein, and mLST8 (also known as G β L), a protein homologous to β subunits of heterotrimeric G proteins. The mTOR/Raptor/mLST8 (also referred to as mTORC1) complex is sensitive to rapamycin and, importantly, in some cases inhibits Akt via a negative feedback loop which involves, at least in part, p70S6K. The relationship between Akt and mTOR is further complicated by the existence of the mTOR/Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR)/mLST8 complex (also referred to as mTORC2), which displays rapamycin-insensitive activity (9). Moreover, Akt directly phosphorylates mTOR on Ser 2448 and activates it.

Downstream of the mTOR are two well-characterized substrates: 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and the p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K). On the one hand, the phosphorylation of 4E-BP1 by mTOR suppresses its ability to bind the translation-initiation factor eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E), a protein that is recruited to the translation initiation complex for regulating protein synthesis and initiating the translation of transcripts encoding genes involved in cell cycle control. On the other hand, mTOR also mediates the phosphorylation and the subsequent activation of p70S6K, which phosphorylates the 40S ribosomal protein S6 to initiate the translation of a 5'-terminal oligopyrimidine tract-containing mRNAs encoding components of the protein synthesis machinery.

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of bone marrow disorders characterized by a defect in the differentiation of the hematopoietic stem cell that causes anemia, neutropenia, bleeding problems, and infections. The disease can result in a slow decrease in blood cell counts, but it may also have a more aggressive evolution, that is a worsening severe cytopenia or, in about 30% of all the patients, transformation into AML. Upon evolution of MDS into AML, the progressing clonal cells present an excessive survival and decreased apoptosis (18-21). Thus, the identification of the aberrant signaling pathways responsible for an increased survival of MDS cells is of high importance, as they might represent promising targets for novel forms of therapy aimed at preventing MDS evolution into AML.

Recently, we have demonstrated that patients affected by high risk MDS frequently demonstrate an activation of Akt, compared to both low risk MDS patients and healthy donors (22). However, in that study, we restricted our investigation to Akt. To better assess the relevance of Akt activation for MDS progression, we decided to investigate some of the downstream Akt targets, including mTOR, p70S6K, and 4E-BP1. Here, we show that mTOR, p70S6K, and 4E-BP1 were phosphorylated in high risk (but not in low risk) MDS patients, and this correlated with Akt activation. No activating mutations were detected in the PI3K p110 α catalytic subunit gene of MDS patients. Furthermore, we demonstrate that rapamycin (an mTOR pharmacological inhibitor) decreased the survival of CD33⁺ cells from high risk MDS patients and negatively affected the clonogenic ability of high risk MDS CD34⁺ precursors. Taken together, our findings indicate a critical role for activated mTOR and its downstream targets as survival factors in patients diagnosed with high risk MDS. Hence, the Akt/mTOR pathway could become an important target for innovative therapeutic strategies in the treatment of high risk MDS.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents. The following antibodies and reagents were purchased from commercial sources. Rabbit polyclonals to Ser473 p-Akt (#4058) and Akt (#9272), to Ser2448 p-mTOR (#2976) and mTOR (#2972), to Ser65 p-4E-BP1 (#9451) and 4E-BP1 (#9452), to Thr202/Tyr204 p-Erk1/2 (#4376) and Erk1/2 (#9102); mouse monoclonal to Thr389 p-p70S6K (#9206) and p70S6K (#9202), all from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Phycoerythrin (PE)-conjugated mouse monoclonal to CD33 or CD71 were purchased from Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany). Secondary antibodies were fluorescein isothiocyanate (FITC) -conjugated F(ab')₂ fragment of sheep anti-mouse IgG (#F2883) and FITC-conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (#F1262, both from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Anti- β -actin (#4967), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (#7074), HRP-conjugated anti-mouse IgG

(#7076), and the Phototope®-HRP Western Blot Detection System (#7071) were from Cell Signaling Technology.

Patient characteristics and isolation of mononuclear cells from bone marrow samples. Bone marrow samples were obtained from 20 patients with MDS and from healthy donors who had given informed consent in accordance with institutional guidelines. All the samples were from the Institute of Hematology and Medical Oncology “L. e A. Seràgnoli” of the Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna, Italy. In all the subjects participating in this study, the diagnosis was defined according to the French American British (F.A.B.) classification (23), while the International Prognostic Scoring System (24) (IPSS) was used to divide the patients into two categories (low and high risk MDS). For *in vitro* experiments, bone marrow mononuclear cells (BMMCs) were isolated by Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) density-gradient centrifugation.

Tissue cell cultures. Human T-lymphoblastoid CEM cells and HL60 acute myeloid leukemia cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and streptomycin/penicillin at an optimal cell density of 0.3-0.8 x 10⁶ cells/mL.

DNA Extraction and Mutation Analysis. Genomic DNA was isolated from total BMMCs by using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Ltd., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. Then, the DNA samples were sequenced, as previously described (25), in order to investigate the presence of mutations in the exons 9 and 20 of the PI3K p110 α subunit gene.

Western blot. Equal number of cells (4 x 10⁶) from CEM and HL60 cells were collected by centrifugation and resuspended in M-PER™ Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)

according to the manufacturer's protocol. The protein content was quantified using a BCA protein assay (Pierce) and equal protein amounts (75 µg) were separated by SDS-PAGE as described elsewhere (22).

Immunocytochemistry analysis. Freshly isolated BMSCs were collected by centrifugation at a density of 0.3×10^6 cells/mL and immunostaining analysis was performed as previously described (22). Slides were incubated with a mixture containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a counterstaining for nuclei, and antifade as a mounting solution (DAPI/Antifade, #RIST 1374, Resnova, Rome, Italy). Finally, slides were examined under epifluorescent illumination. Images were taken on a Zeiss Axio Imager.Z1 microscope, with 60x/NA 1.40 optics, coupled to a computer-driven Zeiss AxioCAM digital camera (MRm), using the Zeiss Axio Vision (version 4.5) software and the Zeiss co-localisation module with constant settings of exposure. For quantification of immunoreactivity, at least 50–100 cells/slide were counted.

CD33⁺ and CD34⁺ Cell Immunomagnetic Positive Selection. CD33⁺ or CD34⁺ cells were obtained from total BMSCs after immunomagnetic separation using either the CD33 mini-MACS selection kit or the CD34 Micro Beads kit (both from Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometric analysis of apoptotic cell death. For sub-G1 (apoptotic cells) peak analysis, CD33⁺ and CD33⁻ cells were cultured in EGM-2 BulletKit medium (Cambrex Bio Science) for 48 h with rapamycin (#R0395, Sigma-Aldrich) or for 24h with LY294002 (#L9908, Sigma-Aldrich). Then, the cells were harvested by centrifugation and prepared as described previously (22). The sub-diploid DNA content was evaluated using an Epics XL flow cytometer with the appropriate

software (System II, Beckman Coulter). At least 10,000 events/sample were acquired. Results were statistically analyzed by GraphPad Prism software (v. 3.0).

Clonogenic assays. Fresh CD34⁺ MDS cells were resuspended in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 2% FBS at a concentration of 8×10^3 cells/mL and added to the methylcellulose complete media (MethoCult GF⁺ H4535, Stem Cell Technologies). Cells were then plated in 35-mm Petri dishes in the presence of rapamycin or LY294002, and incubated in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C) for 14 days. Colonies (> 50 cells) and clusters (< 50 cells) were then evaluated according to Nissen-Druwey's methods (26), scored under an inverted microscope, and statistically analyzed by GraphPad Prism software (v. 3.0).

RESULTS

Patient characteristics. BMBCs fractions from 20 patients diagnosed with MDS were examined in this study. Patient demographics and disease characteristics are summarized in Table 1. Median age was 70.1 years (range 53-79 years). MDS patients were classified according to the IPSS (24), with four subgroups demonstrating different clinical outcomes: low risk, intermediate-1 risk, intermediate-2 risk and high risk. In our study, low risk and intermediate-1 risk were grouped as low risk MDS (n=5), whilst intermediate-2 risk and high risk were grouped as high risk MDS (n=15). Karyotype alterations were present in about 30% of the patients. Five of the high risk MDS patients evolved into AML.

Specificity of the antibodies. Since in most MDS cases the number of cells available for analytical purposes represents a limiting factor, we decided to evaluate the activation of the Akt/mTOR pathway in BMBCs by immunocytochemistry. Therefore, a very critical issue concerned the

specificity of the antibodies used in our study. For this reason, a series of control experiments were first performed to validate the antibodies employed in this investigation, using immunofluorescent staining and western blot. To this end, we employed the human T-lymphoblastoid CEM cell line, having high levels of p-Akt (27), and the HL60 cell line, having none or very low levels of p-Akt (28). Regarding the expression of Akt, CEM cells displayed high levels of Ser473 p-Akt, whereas HL60 cells demonstrated very low immunoreactivity towards Ser473 p-Akt antibody, as expected (Figure 1A). Control experiments were always performed excluding the primary antibody, to verify that the secondary antibody did not result in unspecific immunostaining (data not presented).

Given that a cross talk between the Akt and Erk1/2 pathway has been demonstrated (29), we also analyzed the activation of Erk1/2 in our cell lines using both immunofluorescence staining and western blot. Indeed, Akt phosphorylates and downregulates Raf which is an upstream activator of the MEK/Erk1/2 pathway. Accordingly, CEM cells were negative for Thr202/Tyr204 p-Erk1/2, whereas HL60 cells demonstrated higher immunoreactivity towards Thr202/Tyr204 p-Erk1/2 antibody (Figure 1B).

Control experiments were also performed with the other phospho-specific antibodies to Ser 2448 p-mTOR, Ser65 p-4E-BP1, and Thr389 p-p70S6K. Immunofluorescence microscopy analysis demonstrated that CEM cells had high levels of these antigens, whereas HL60 had very low levels (Figure 1C). To further validate the results obtained with immunocytochemical staining, we also performed Western blot analysis. As shown in Figure 1B-C, this technique revealed that CEM cells had an overall activation of the signaling pathway, whereas HL60 displayed absent Akt phosphorylation and extremely low levels of Ser 2448 p-mTOR, Ser65 p-4E-BP1, and Thr389 p-p70S6K. All cells analyzed (CEM and HL60) always expressed total Akt, mTOR, 4E-BP1 and p70S6K, as revealed by western blot (Figure 1B-C). Taken together, these results demonstrated the specificity of the antibody used for immunocytochemistry.

Ser473 p-Akt levels and Thr202/Tyr204 p-Erk1/2 in normal and MDS mononuclear cells. The level of Akt and Erk1/2 activation was investigated in BMMCs from healthy donors and MDS patients. As Figure 2A shows, normal BMMCs and low risk MDS displayed barely detectable levels of Ser473 p-Akt, whereas high risk MDS showed an activation of Akt. The proportion of p-Akt positive cells varied for different high risk MDS cases, with an average of 50-70% positive cells per sample. As for Thr202/Tyr204 Erk1/2, normal BMMCs and low risk MDS displayed activation of Erk1/2, whereas high risk MDS showed much lower levels of p-Erk1/2 (Figure 2B). Results from all patients analyzed by immunocytochemistry (n=20) are summarized in Table 2. Overall, these results confirmed our own previous findings (22).

mTOR and its down-stream targets are activated in high risk MDS BMMCs. The levels of Ser2448 p-mTOR, Thr389 p-p70S6K, and Ser65 p-4E-BP1 were then analyzed by immunocytochemistry in healthy donors BMMCs and compared to those of BMMCs from high and low risk MDS patients. High risk MDS patients always demonstrated enhanced levels of these phosphorylated proteins, as compared to either low risk MDS cells or healthy donors (Figure 2C). Results from all patients (n=20) analyzed by immunocytochemistry for these antigens are summarized in Table 2. In agreement with the p-mTOR capability of targeting both p-p70S6K and p-4E-BP1, high risk MDS patients who showed a high levels of p-mTOR ($p\text{-mTOR} \geq 3$) also displayed enhanced levels of both p-p70S6K and p-4E-BP1. On the contrary, patients with low levels of p-mTOR ($0 \leq p\text{-mTOR} \leq 2$) showed reduced levels of both p-p70S6K and p-4E-BP1.

Lineage identity of p-Akt and p-mTOR positive cells in high risk MDS patients. Lineage identity of cells presenting a positive staining towards p-Akt and p-mTOR, was established by double immunolabeling total BMMCs with a myeloid-specific marker, CD33 (30). Furthermore, to evaluate the lineage specificity of the cells, we tested another marker, CD71, which is specific for the erythroid lineage (31). As shown in Figure 3, BMMCs from high risk MDS patients which were

positive for CD33 displayed a high immunoreactivity also towards Ser473 p-Akt and Ser2448 p-mTOR. On the contrary, cells which were positive for CD71 showed low levels of p-Akt and p-mTOR.

Rapamycin increases apoptotic cell death in CD33⁺ cells from high risk MDS patients. CD33⁺ and CD33⁻ fractions were purified from total BMMCs and treated for 48h with rapamycin, in order to inhibit the activation of the mTOR pathway, or for 24h with LY294002, which selectively inhibits PI3K. Then, apoptosis was quantified by flow cytometric analysis. Under basal conditions, the percentage of apoptotic cells in control samples was higher in healthy donors and low risk MDS, as compared to high risk MDS patients, as expected. However, upon treatment with rapamycin, healthy donors and low risk MDS patients showed little variations in the percentage of apoptotic cells, in either the CD33⁺ or CD33⁻ fraction. On the contrary, high risk MDS cells were much more sensitive to rapamycin, displaying a significant increase in apoptotic cells in the CD33⁺ fraction, whereas CD33⁻ cells were much less responsive to the treatment (Figure 4A). Since a recent study (32) evidenced that rapamycin could result in additional Akt activation through a feedback mechanism, we also analyzed the levels of p-Akt in BMMCs from high risk MDS patients after treatment with rapamycin. However, under our experimental conditions, the inhibition of mTOR did not result in further Akt activation (Figure 4B). In high risk MDS cases, LY294002 did not significantly change the number of apoptotic cells, whereas it induced apoptosis in CEM cells when employed at the same concentrations (Figure 4C). Considering that LY294002 did not significantly increase the percentage of apoptotic CD33⁺ cells, we investigated whether or not the p110 α catalytic subunit gene of PI3K displayed activating mutations in MDS patients. Indeed, activating mutations of this gene have been discovered in a wide variety of cancers (33,34). However, we did not find any genomic mutations in all the MDS patients analyzed (Table 2).

Clonogenic assays. The effect of rapamycin or LY294002 on the clonogenic capability of CD34⁺ cells from high risk MDS patients was investigated next. MDS cells were plated in methylcellulose media with increasing concentrations of rapamycin or LY294002 and colonies were scored after 14 days of culture. In accordance with Nissen-Druey's observations (26), high risk MDS cells originated only few small colonies, characterized by macrophage aggregates and small eosinophilic colonies. In contrast, CD34⁺ cells from healthy donors showed a normal differentiation, in that every type of lineage (erythroid, lymphoid, myeloid) could be visible after 14 days of culture. Overall, rapamycin did not influence the clonogenic capability of CD34⁺ cells from healthy donors, nor from low risk MDS patients (Figure 5A-B). In fact, the number of colonies in healthy donors was not affected by the drug, whereas low risk MDS displayed a slight but non significant decrease in the percentage of colony growth after treatment with rapamycin, as compared to healthy donors. In contrast, the size and number of colonies from high risk MDS patients were significantly inhibited by rapamycin, in a dose-dependent manner (Figure 5C). Regarding the effects of LY294002, the drug did not significantly reduced the growth of colonies in high risk MDS patients (Figure 5D).

DISCUSSION

Several lines of evidence indicate that the PI3K/Akt signaling pathway plays an important role in both cell proliferation and apoptosis, and its activation has frequently been linked with tumor progression. In particular, this signal transduction network could be involved in leukemogenesis (8-10), as several reports demonstrated that the PI3K/Akt activation protects AML blasts from undergoing apoptosis (11-13). Furthermore, recent studies have evidenced that the evaluation of either Akt phosphorylation status (35) or PI3K p110 δ expression (36), and the analysis of PI3K p110 α catalytic subunit gene somatic mutations (33,34) in AML blasts may function as prognostic markers for studying the disease progression.

The MDS are a group of hematopoietic stem cell disorders characterized by ineffective hematopoiesis and by a high risk of evolution into AML (37). Our recent studies have suggested that lipid-dependent signal transduction pathways could play an essential role in the progression of MDS (22,38-40), particularly the activation of the PI3K/Akt pathway which was demonstrated in high risk MDS patients (22).

In this study, we investigated the functional status of some downstream targets of Akt, i.e. mTOR, 4E-BP1, and p70S6K. By immunocytochemical analysis, we examined the phosphorylation levels of these proteins in MDS BMNCs, using healthy donors as controls for comparison of staining intensity. We found that not only mTOR was activated, but also its downstream kinases, 4E-BP1 and p70S6K, which are involved in both cell proliferation and cancer progression. Either high risk or low risk MDS patients showed detectable levels of p-mTOR, p-4E-BP1 and p-p70S6K, but the staining intensity was different. Indeed, high risk MDS patients displayed high levels of p-mTOR and its downstream targets, p-4E-BP1 and p-p70S6K. On the other hand, low risk MDS patients were only weakly positive for p-mTOR and its targets, as well as for p-Akt, while healthy donors were always negative

To assess the relevance of the Akt/mTOR pathway activation for the survival and proliferation of MDS cells we employed rapamycin, a macrolide that inhibits the mTOR-dependent downstream signaling pathways and is currently used alone or in combination with cyclosporine as an immunosuppressive drug (41-43). Interestingly, over the last few years rapamycin has also undergone clinical trials (44,45) for the treatment of AML and other malignant hematological disorders. Rapamycin does not directly inhibit mTOR, but rather binds to its immunophilin, FK506 binding protein 12 (FKBP12). Then, rapamycin/FKBP12 complex binds to mTOR complexed with Raptor and inhibits down-stream signaling events.

We isolated CD33⁺ and CD33⁻ cells from healthy donors or MDS cells so that the two fractions could be treated with increasing concentrations of rapamycin. Interestingly, the basal levels of apoptosis in CD33⁺ cells from healthy donors and low risk MDS was higher than in the

same fraction from high risk MDS patients and did not change in response to rapamycin treatment. On the contrary, untreated CD33⁺ cells from high risk MDS patients demonstrated a lower percentage of apoptotic cells, strongly suggesting that in these patients anti-apoptotic mechanisms were activated, and the treatment with rapamycin inhibited at least some of these pro-survival signals, leading to a significant increase in apoptosis. The findings indicating a selective toxicity of rapamycin on CD33⁺ cells are fully consistent with the fact that the mTOR activation was detected in CD33⁺ cells, but not in CD71⁺ cells from high risk MDS patients. This observation seems to indicate that the activation of the Akt/mTOR pathway is selective for the myeloid lineage and could also explain why MDS evolution into erythroleukemia is an exceptional event (31).

Furthermore, we performed methylcellulose-based clonogenic assays with CD34⁺ MDS cells. Our results show that in CD34⁺ cells from high risk MDS rapamycin significantly inhibited the growth of colonies in a dose-dependent manner, whilst the treatment did not influence the clonogenic ability of CD34⁺ cells from neither healthy donors nor low risk MDS.

Another important finding of our study is that rapamycin treatment did not result in further activation of Akt as could be expected, since it was initially thought that rapamycin would inhibit mTORC1 but not TORC2, and this could result in additional Akt up-regulation (46). Nevertheless, recent results have highlighted that prolonged treatment with rapamycin could also inhibit mTORC2 and, as a consequence, down-regulate Akt phosphorylation (47).

Interestingly, we demonstrated that in high risk MDS samples Erk1/2 was not activated, whilst healthy donors and low risk MDS showed a higher amount of active Erk1/2. This findings underscores a difference between MDS and AML, where both Erk1/2 and Akt are usually strongly activated in the same patients (29). Given that LY294002 was not effective in inducing apoptosis or reducing clonogenic capability, it is conceivable that in high risk MDS the activation of Akt is PI3K-independent. This hypothesis was also strengthened by the absence of activating genomic mutations in the PI3K p110 α subunit gene, which have not been found in our MDS patients. Moreover, our preliminary results showed that a selective inhibitor for PI3K δ (48), which was

highly effective in AML patients to inhibit cell proliferation, had no effect in our high risk MDS samples. This is another difference between MDS and most AML cases, as far as activation of PI3K/Akt is concerned, even though PI3K-independent Akt up-regulation has been reported in a few AML cases (9) .

It might be that Akt activation in MDS samples is related to protein kinase C- β , which has been demonstrated to represent a potential alternative pathway for Akt upregulation in both chronic lymphocytic leukemia (49) and multiple myeloma (50). Alternatively, Akt up-regulation in MDS might be due to decreased activity of protein phosphatases acting on phosphorylated Akt forms (9).

Taken together, our results show that in high risk MDS patients the Akt/mTOR pathway is over-activated, and that this leads to an imbalance in the apoptotic processes. Therefore, this survival network is likely to play an important role in the MDS pathogenesis and contribute to the malignant growth of MDS cells. Furthermore, our findings indicate that the mTOR pathway is specifically up-regulated in the hematopoietic myeloid progenitors of high risk MDS patients. In fact, rapamycin, but not LY294002, influenced the clonogenic ability of CD34⁺ MDS cells by reducing the size and number of the colonies. It is interesting that in a very recent pilot study, sirolimus (rapamycin) was used with some success in advanced MDS patients (44). However, in that investigation no functional evaluation of the Akt/mTOR axis was performed. Therefore, we feel that our data are complementary to those findings and strengthen the concept that the Akt/mTOR axis could become in the future an important target for the development of innovative strategies for the MDS treatment.

REFERENCES

1. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006;7:606-19.
2. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2006;108:2358-65.
3. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:249-79.
4. Kim D, Cheng GZ, Lindsley CW, Yang H, Cheng JQ. Targeting the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6:1250-8.
5. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005;94:29-86.
6. Stauffer F, Holzer P, Garcia-Echeverria C. Blocking the PI3K/PKB pathway in tumor cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005;5:449-62.
7. Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 2005;65:2047-53.

8. Samstag Y, Nebl G. Ras initiates phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K)/PKB mediated signalling pathways in untransformed human peripheral blood T lymphocytes. *Adv Enzyme Regul* 2005;45:52-62.
9. Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20:911-28.
10. Schade AE, Powers JJ, Wlodarski MW, Maciejewski JP. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood* 2006;107:4834-40.
11. Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF- κ B, MAPK and p53 pathways. *Leukemia* 2005;19:586-94.
12. Zeng Z, Samudio IJ, Zhang W, et al. Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2006;66:3737-46.
13. Brandts CH, Sargin B, Rode M, et al. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res* 2005;65:9643-50.

14. Martelli, AM, Tabellini G, Bortul R, et al. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol* 2005;20:239-52.
15. Tee AR, Blenis J. mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:29-37.
16. Xu RH, Pelicano H, Zhang H, Giles FJ, Keating MJ, Huang P. Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia* 2005;19:2153-8.
17. Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, et al. Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res* 2006;66:6589-97.
18. Braun T, Carvalho G, Coquelle A, et al. NF- κ B constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006;107:1156-65.
19. Katsoulidis E, Li Y, Yoon P, et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cytokine-mediated hematopoietic suppression in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 2005;65:9029-37.
20. Tehranchi R, Fadeel B, Schmidt-Mende J, et al. Antiapoptotic role of growth factors in the myelodysplastic syndromes: concordance between in vitro and in vivo observations. *Clin Cancer Res* 2005;11:6291-9.

21. Navas TA, Mohindru M, Estes M, et al. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood* 2006;108:4170-7.
22. Nyakern M, Tazzari PL, Finelli C, et al. Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia* 2006;20:230-8.
23. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:188-99.
24. Greenberg, P, Cox C, Le Beau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes *Blood* 1997;89:2079-88.
25. Malaponte G, Libra M, Gangemi P, et al. Detection of BRAF gene mutation in primary choroidal melanoma tissue. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:225-7.
26. Nissen-Druey C, Tichelli A, Meyer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol* 2005;113:5-96.
27. Mantovani I, Cappellini A, Tazzari PL, et al. Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells. *J Cell Physiol* 2006;207:836-44.
28. Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J Cell Physiol* 2005;202:623-34.

29. Ricciardi MR, McQueen T, Chism D, et al. Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:1543-9.
30. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 1994;18:187-98.
31. Kowal-Vern A, Mazzella FM, Cotelingam JD, Shrit MA, Rector JT, Schumacher HR. Diagnosis and characterization of acute erythroleukemia subsets by determining the percentages of myeloblasts and proerythroblasts in 69 cases. *Am J Hematol* 2000;65:5-13.
32. Ikezoe T, Nishioka C, Bandobashi K, et al. Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res* 2006; in press.
33. Bousquet M, Recher C, Queleen C, Demur C, Payastre B, Brousset P. Assessment of somatic mutations in phosphatidylinositol 3-kinase gene in human lymphoma and acute leukaemia. *Br J Hematol* 2005;131:411-3.
34. Liu Z, Roberts TM. Human tumor mutants in the p110 α subunit of PI3K. *Cell cycle* 2006;5:675-7.
35. Min YH, Eom JI, Cheong JW, et al. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 2003;17:995-7.

36. Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, et al. Essential role for the p110 δ isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:1063-6.
37. Catenacci DV, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood Rev* 2005;19:301-9.
38. Cocco L, Manzoli L, Palka G, Martelli AM. Nuclear phospholipase C β 1, regulation of the cell cycle and progression of acute myeloid leukemia. *Adv Enzyme Regul* 2005;45:126-35.
39. Lo Vasco VR, Follo MY, Cocco L. Reply to Herens et al. *Leukemia*. 2006;20:522-3.
40. Follo MY, Bosi C, Finelli C, et al. Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLC β 1 gene expression in myelodysplastic syndrome. *Int J Mol Med* 2006;18:267-71.
41. Giles FJ, Albitar M. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in leukemia. *Curr Mol Med* 2005;5:653-61.
42. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005;16:525-37.
43. Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;105:2527-34.

44. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, et al. Phase I/II Study of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Everolimus (RAD001) in Patients with Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* 2006;12:5165-73.
45. Platzbecker U, Haase M, Herbst R, et al. Activity of sirolimus in patients with myelodysplastic syndrome-results of a pilot study. *Br J Haematol* 2005;128:625-30.
46. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307:1098-101.
47. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta, S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006;22:159-68.
48. Billottet C, Grandage VL, Gale RE, et al. A selective inhibitor of the p110 δ isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene* 2006;25:6648-59.
49. Barragan M, de Frias M, Iglesias-Serret D, et al. Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β . *J Leukoc Biol* 2006;80:1473-9.
50. Rizvi MA, Ghias K, Davies KM, et al. Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C β inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1783-9.

Table 1. Patients' characteristics.

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

* Classified according to the International Prognostic Scoring System (IPSS)

† More than three chromosomal aberrations

Table 2. The expression of Ser473 p-Akt, Ser2448 p-mTOR, Ser65 p-4E-BP1 and Thr389 p-p70S6K in high risk and low risk MDS patients.

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

*Patients that evolved from MDS to AML. BMMCs: bone marrow mononuclear cells. Quantification of immunofluorescence staining intensity: CEM cells (set as 5) were considered as a positive control, whilst HL60 cells were considered as a negative control (set as 0).

FIGURE AND LEGENDS

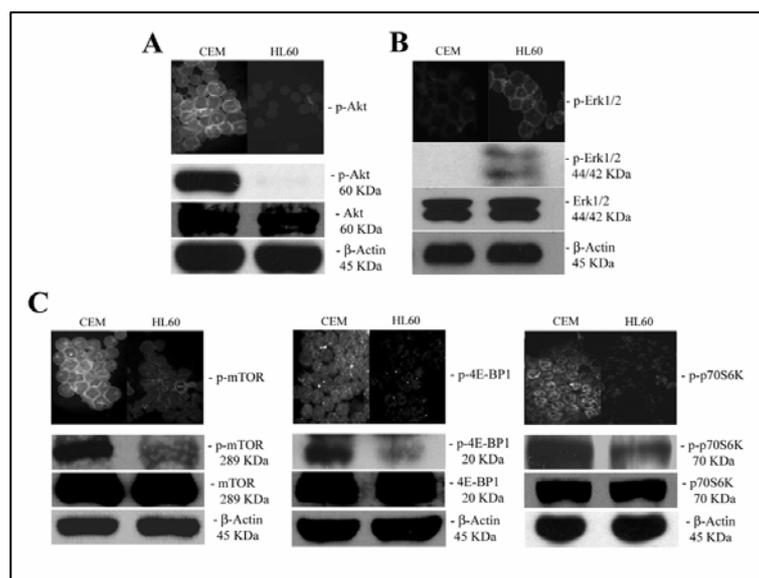


Figure 1. Activation state of the Akt/mTOR pathway in CEM and HL60 cell lines.

Representative immunofluorescence (original magnification x 600) and western blot analysis (75 μ g of protein lysates) showing total and phosphorylated protein levels in CEM and HL60 cell lines. (A) Ser473 p-Akt and total Akt; (B) Thr202/Tyr204 p-Erk1/2 and total Erk1/2; (C) Ser2448 p-mTOR and total mTOR; Ser65 p-4E-BP1 and total 4E-BP1; Thr389 p-p70S6K and total p70S6K. Under basal conditions, CEM cells displayed undetectable levels of p-Erk1/2, whilst HL60 cells showed higher levels. On the other hand, HL60 cells did not display detectable amounts of p-Akt and showed very low levels of p-mTOR, p-4E-BP1 and p-p70S6K, whereas in CEM cells the Akt/mTOR pathway was activated. β -actin was used for loading control in western blot experiment.

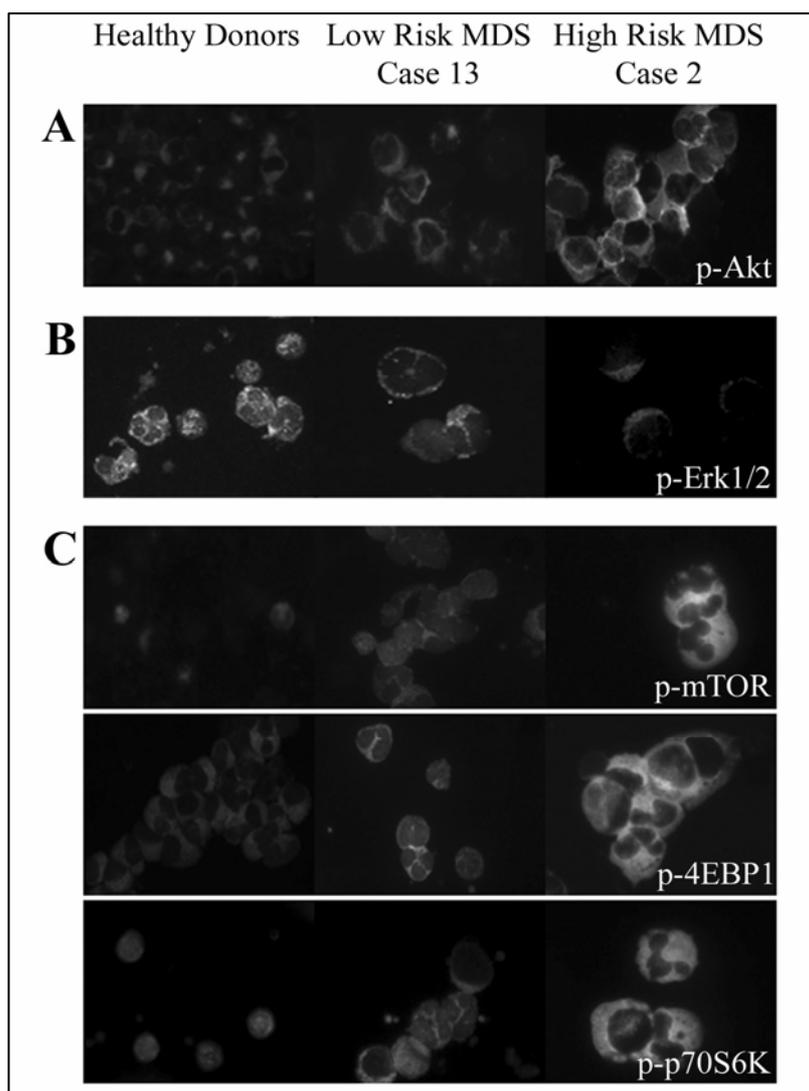


Figure 2. Immunocytochemical analysis of p-Akt, p-mTOR, p-4E-BP1 and p-p70S6K levels in healthy donors, low risk and high risk MDS patients. Representative immunofluorescence analysis of BMNCs from healthy donors, low risk (case no.13) and high risk MDS (case no.2) patients. Original magnification x 600. (A) Immunostaining with Ser473 p-Akt antibody; (B) Immunostaining with Thr202/Tyr204 p-Erk1/2 antibody. (C) Immunostaining with Ser2448 p-mTOR antibody, with Ser65 p-4E-BP1 antibody and with Thr389 p-p70S6K antibody.

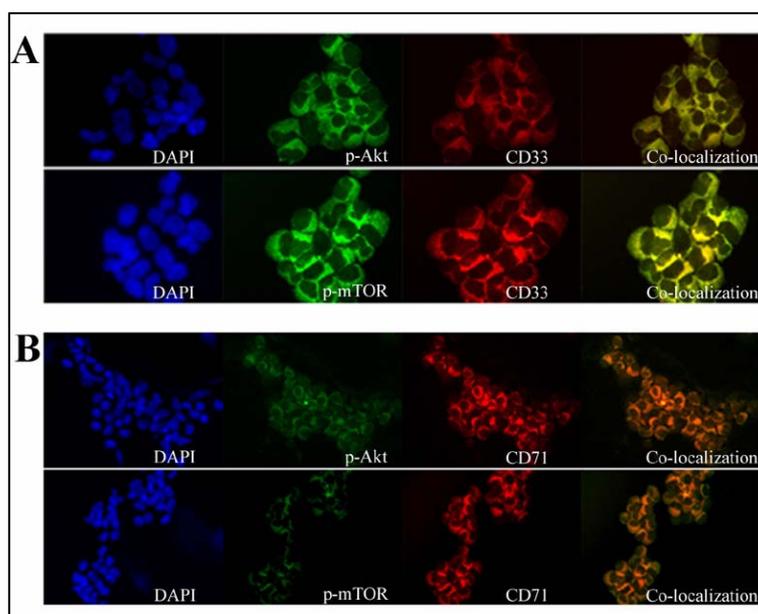


Figure 3. Identification of the lineage identity of BMMCs with p-Akt and p-mTOR activation.

Representative immunocytochemical analysis (case no.7) of BMMCs from high risk MDS patients (original magnification x 600). Nuclei are visualized by DAPI staining (blue signal). (A) Levels of Ser473 p-Akt and Ser2448 p-mTOR in high risk MDS (green signal). The identification of CD33⁺ cells was performed with a PE-conjugated anti-CD33 antibody (red signal). The merged image for p-Akt and CD33⁺ staining indicates co-localization of the two antigens (yellow signal). (B) Levels of Ser473 p-Akt and Ser2448 p-mTOR in high risk MDS (green signal). The identification of CD71⁺ cells was performed with a PE-conjugated anti-CD71 antibody (red signal). The merged image for p-mTOR and CD71⁺ staining indicates co-localization of the two antigens (orange signal).

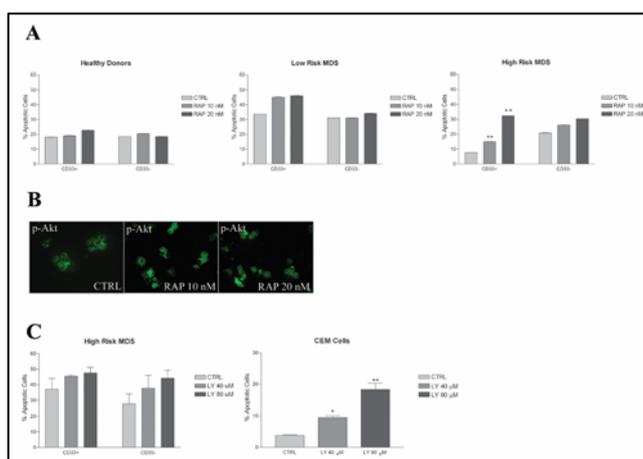


Figure 4. Rapamycin, but not LY294002, selectively increases apoptotic cell death in the CD33⁺ fraction from high risk MDS patients. (A) Flow cytometric detection of apoptotic cells in CD33⁺ and CD33⁻ fractions of healthy donors, low risk MDS and high risk MDS, after treatment for 48h with increasing concentrations of rapamycin (0 nM, 10 nM, 20 nM). No significant difference was seen in the percentage of apoptotic cells in healthy donors or low risk MDS after treatment with rapamycin. As for high risk MDS, the percentage of apoptotic CD33⁺ cells was significantly increased after rapamycin treatment, whereas the CD33⁻ fraction was not significantly affected. Histograms are representative of three independent experiments \pm SD. * p <0.05 vs. CTRL (control cells), ** p <0.01 vs. CTRL (Dunnett test after ANOVA). (B) Representative immunofluorescence analysis of Ser473 p-Akt staining in CD33⁺ cells after treatment with rapamycin (original magnification x 600); at the concentrations used, there was no increase in the p-Akt levels, indicating that rapamycin does not further activate Akt through a feedback mechanism. RAP: rapamycin. (C) Flow cytometric detection of apoptotic cells from high risk MDS patients and CEM cells after a 24h treatment with increasing concentrations of LY294002. No significant difference was seen in the percentage of apoptotic cells neither in CD33⁺ nor in CD33⁻ cells from high risk MDS, whilst CEM cells were responsive to this treatment. Histograms are representative of three independent experiments \pm SD. * p <0.05 vs. CTRL (control cells), ** p <0.01 vs. CTRL (Dunnett test after ANOVA).

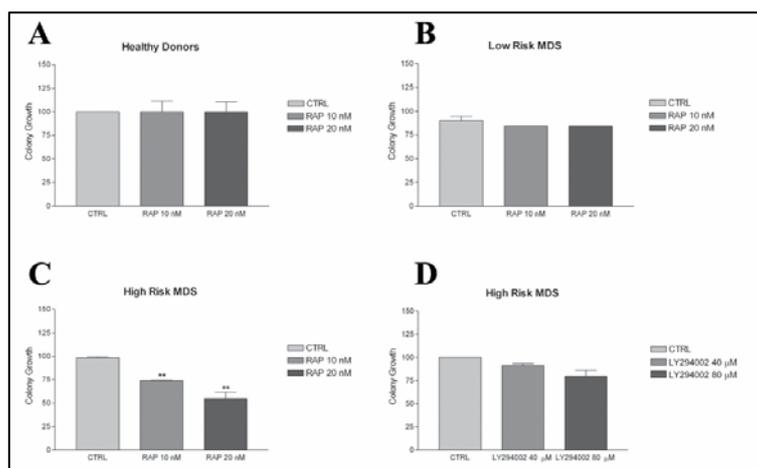


Figure 5. Rapamycin, but not LY294002, negatively affects the clonogenic capability of CD34⁺ cells from high risk MDS patients. High risk, low risk MDS and healthy donors CD34⁺ cells were incubated in the appropriate media in the presence of increasing concentrations of rapamycin or LY294002. The colonies (> 50 cells) were scored at day 14. (A) Healthy donors: rapamycin did not influence the colony growth; (B) Low risk MDS patients: rapamycin slightly reduced the number and size of the colonies, but the differences were not statistically significant; (C) High risk MDS: rapamycin significantly inhibited both the number and size of the colonies. RAP: Rapamycin. (D) High risk MDS: LY294002 reduced slightly, but not significantly, the number and the size of the colonies. Results are expressed as percentage of control and are mean \pm SD of duplicates from three independent experiments. **P<0.01 vs. CTRL (control, Dunnett test after ANOVA).