

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 05/H2

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/17

**LA FOSFOLIPASI C β 1 (PLC β 1) E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA:
STUDIO DELLA CORRELAZIONE TRA LA PLC β 1 E I MECCANISMI
EPIGENETICI ALLA BASE DELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA**

**Presentata da:
CRISTINA MAZZETTI**

Coordinatore Dottorato

Prof. LUCIO ILDEBRANDO COCCO

Supervisore

Prof.ssa MATILDE Y. FOLLO

Esame finale anno 2018

ABSTRACT

La fosfolipasi C β 1 (PLC β 1) e la Leucemia Mieloide Acuta: studio della correlazione tra la PLC β 1 e i meccanismi epigenetici alla base della Leucemia Mieloide Acuta

Lo scopo della presente tesi è stato quello di studiare la relazione tra la via di segnalazione dei messaggeri inositidici, in particolare la fosfolipasi C beta 1 (PLC β 1), e la Leucemia Mieloide Acuta (LAM), con l'obiettivo di identificare nuovi potenziali target terapeutici.

Il principale problema legato alla LAM, che ancora non ha trovato soluzione, è il fatto che le attuali terapie convenzionali, non riescono ad eradicare completamente i blasti leucemici. A questo si aggiungono altri motivi di insuccesso terapeutico, ossia l'insorgenza di farmaco resistenza, ricadute e tossicità fatale nei pazienti. Per questi motivi è necessario sviluppare nuovi, più efficaci e più mirati trattamenti terapeutici per la LAM.

Numerose evidenze sperimentali hanno ormai stabilito la presenza nel nucleo di fosfoinositidi (PIP) e degli enzimi che li regolano, che nell'insieme partecipano a vie di segnalazione nucleari indipendenti rispetto a quelle citoplasmatiche. Fra questi enzimi nucleari, la PLC β 1 ricopre un ruolo importante nel controllare la proliferazione e il differenziamento cellulare. Recentemente, numerosi studi hanno inoltre dimostrato il potenziale ruolo dei PIP nucleari e dei loro enzimi regolatori nel controllo diretto dei fattori responsabili delle modificazioni dello stato della cromatina.

Da precedenti risultati (dati non ancora pubblicati), ottenuti all'interno del gruppo di ricerca in cui mi sono inserita, è emerso che solo il silenziamento (mediante *short hairpin* RNA - *sh*RNA) dell'isoforma β 1 fra tutte le PLC è capace di ridurre significativamente la crescita neoplastica dei blasti leucemici umani, se paragonato al silenziamento di tutte le altre isoforme di PLC.

L'ipotesi su cui si basa il presente studio è che l'inibizione della proliferazione neoplastica nella LAM, indotta dal silenziamento della PLC β 1 sia causata, almeno in parte, dalla sua capacità di modulare il *signaling* epigenetico che è responsabile dell'espressione di geni (geni HOXA) indispensabili per la patogenesi della LAM. Nello specifico si ipotizza che la PLC β 1 interagisca e regoli l'attività di due demetilasi dell'istone H3K9 (H3K9_{me3}), ossia KDM4A e KDM4C.

Per studiare il ruolo della PLC β 1 nella LAM, l'espressione di questo enzima è stata silenziata stabilmente mediante trasduzione lentivirale di *sh*RNA in una linea cellulare di LAM con traslocazione t(9;11) MLL-AF9, ossia le THP-1. La mancata espressione dell'enzima PLC β 1 induce una significativa diminuzione della crescita cellulare. Le THP-1 silenziate per la PLC β 1 hanno mostrato una significativa riduzione della loro capacità di formare colonie e il silenziamento della PLC β 1 è sufficiente ad indurre un importante arresto delle cellule in fase G₀/G₁ del ciclo cellulare, con modulazione dell'espressione proteica di alcuni dei fattori implicati nella sua regolazione (pRbser780, pRbser807/811, p21 e p27). La PLC β 1 sembra essere coinvolta anche in meccanismi apoptotici caspasi-dipendenti, in quanto il suo silenziamento porta ad un aumento significativo della percentuale di apoptosi nelle THP-1. Non solo, l'assenza di questo enzima determina una importante diminuzione dell'espressione dei geni HOXA, che sono iperespressi nella LAM e responsabili della proliferazione incontrollata dei blasti leucemici. Dato il ruolo importante della PLC β 1 nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche, è stata quindi indagata la possibile relazione tra questo enzima e differenti fattori epigenetici implicati nella patogenesi della LAM. Il silenziamento KDM4A o KDM4C nelle THP-1, due enzimi che demetilano H3K9 sul promotore dei geni HOXA e promuovono proliferazione neoplastica, riduce significativamente la capacità di crescita delle cellule e mostra un fenotipo simile a quello ottenuto silenziando la PLC β 1, in quanto l'espressione dei geni HOXA risulta essere anche in questo caso

significativamente sottoregolata. Questo ha suggerito un potenziale meccanismo comune tra la PLC β 1 e KDM4. Dai miei studi è emerso che questi due enzimi interagiscono direttamente tra di loro mediante la formazione di un complesso proteico e presentano un profilo di espressione genica comune. Infatti sono stati identificati differenti geni che risultano essere o iporegolati o iperregolati quando è silenziata la PLC β 1 o KDM4A/4C nelle THP-1. Il silenziamento di questi geni produce un fenotipo di crescita neoplastica estremamente simile a quello ottenuto con la PLC β 1 o KDM4, ossia il potenziale proliferativo delle cellule silenziate si riduce significativamente.

Studi preliminari condotti mediante Chip-qRT hanno mostrato che il potenziale meccanismo epigenetico alla base della regolazione dei geni HOXA da parte della PLC β 1 sembra essere la modulazione dello stato di metilazione dell'istone H3K9_{me3} sul loro promotore. Interagendo direttamente con KDM4A, la PLC β 1 ne regolerebbe l'attività demetilasi, influenzando di conseguenza l'assetto epigenetico dei geni HOXA. Quando la PLC β 1 è silenziata, vi è un arricchimento della metilazione dell'H3K9 (H3K9_{me3}) a livello del promotore. Poiché la metilazione è segnale di inibizione della trascrizione genica, questo spiegherebbe in parte, come il silenziamento della PLC β 1 è capace di indurre repressione dell'espressione dei geni HOXA.

Complessivamente, i dati ottenuti mostrano l'esistenza di un meccanismo di controllo epigenetico da parte dei fosfoinositidi innovativo all'interno della LAM, dimostrando una loro implicazione nella patogenesi di questa malattia. E' quindi interessante andare ad approfondire questa tematica allo scopo di poter associare un inibitore per la PLC β 1 con nuove combinazioni di fattori epigenetici che possano agire in sinergia per invertire questa trascrizione genica disregolata e quindi inibire la progressione del fenotipo leucemico.

SOMMARIO

INTRODUZIONE	5
EMOPOIESI.....	5
LE LEUCEMIE	6
LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA (LAM).....	7
I. CLASSIFICAZIONE DELLA LAM	7
II. APPROCCI TERAPEUTICI ALLA LAM.....	8
III. CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE (LSC).....	9
I FOSFOINOSITIDI.....	10
I. LA VIA DI SEGNALAZIONE DEI FOSFOINOSITIDI.....	10
II. LA VIA DI SEGNALAZIONE FOSFOINOSITIDICA NUCLEARE	13
III. I FOSFOINOSITIDI NUCLEARI.....	14
IV. IL DOMINIO PHD	14
V. FOSFATIDIL INOSITOLO-4,5-BISFOSFATO NUCLEARE	15
LA FAMIGLIA DELLE FOSFOLIPASI C (PLC)	16
I. ISOFORME DELLA PLC: FOCUS SULLA PLC β 1	18
II. VARIANTI DI SPLICING DELLA PLC β 1: PLC β 1a E PLC β 1b.....	18
III. RUOLO DELLA PLC β 1: CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE E DEL DIFFERENZIAMENTO	19
PLC E TUMORE	21
I. PLC COME BERSAGLIO FARMACOLOGICO.....	22
LA CROMATINA.....	23
MLL (mixed lineage leukemia).....	25
I. MLL E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	26
II. MLL-AF9 E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	27
III. I GENI HOX.....	28
IV. I GENI HOXA E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	30

V. HOXA9 E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	31
I REGOLATORI EPIGENETICI.....	33
I. LA FAMIGLIA DELLE ISTONE DEMETILASI (KDM)	33
II. KDM4 E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA.....	33
III. KDM4A E KDM4C.....	34
IV. DOT1L - SIRT1 - SUV39H1 / H2 E IL LORO RUOLO NELLA LAM.....	35
NUOVI POTENZIALI TARGET TERAPEUTICI.....	39
SCOPO DELLA TESI	41
MATERIALI E METODI	43
1. LINEE CELLULARI	43
2. SILENZIAMENTO DELLE THP-1	43
2.1. GENERAZIONE DEL VETTORE LENTIVIRALE	43
2.2. TRASFEZIONE DELLE THP-1 (SPINOCULAZIONE).....	45
2.3. SELEZIONE DELLE THP-1 TRASFETTATE.....	45
3. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA: REAL TIME PCR.....	45
3.1. ESTRAZIONE DELL'RNA.....	46
3.2. RETROTRASCRIZIONE DELL'mRNA	46
3.3. REAL TIME PCR	46
4. ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA: WESTERN BLOT.....	47
5. SAGGIO CLONOGENICO	48
6. CRESCITA COMPETITIVA.....	49
7. CICLO CELLULARE.....	49
8. INIBIZIONE DELLA FOSFOLIPASI C CON U73122.....	49
9. SAGGI APOPTOTICI.....	50
10. RIPRISTINO DEL FENOTIPO LEUCEMICO.....	50
10.1 SILENZIAMENTO DI SUV39H1 E SUV39H2 NELLE THP-1	50
10.2 SILENZIAMENTO DI DHRS9 NELLE THP-1	50
11. ATTIVAZIONE DI SIRT1 NELLE THP-1	50

12. SAGGI DI CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE (Co-IP)	51
13. MICROARRAY	52
14. VALIDAZIONE DEI MICROARRAY	52
15. IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA (ChiP)	52
16. TRASFORMAZIONE DEI BATTERI	53
17. ANALISI STATISTICA	54
RISULTATI	55
CONTROLLO DEL SILENZIAMENTO DELLA PLC β 1	55
VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DELLA PLC β 1	56
VALUTAZIONE DELL'EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO	57
SAGGIO CLONOGENICO	57
CRESCITA COMPETITIVA	58
VALUTAZIONE DEL CICLO CELLULARE	59
ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI HOXA e MEF2C	60
INIBIZIONE DELLA FOSFOLIPASI C CON U73122	62
VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROAPOPTOTICO	63
SILENZIAMENTO DI SUV39H1 E SUV39H2 NELLE THP-1 SILENZIATE PER LA PLCB1: RIPRISTINO DEL FENOTIPO LEUCEMICO	66
ATTIVAZIONE DI SIRT1 NELLE THP-1	67
SILENZIAMENTO DI KDM4A e KDM4C NELLE THP-I	69
ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA: REAL TIME PCR	69
ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA: WESTERN BLOT	70
STUDIO DEGLI EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI KDM4A E KDM4C	71
SAGGIO CLONOGENICO	71
ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI HOXA e MEF2C	72
STUDIO DELL'INTERAZIONE TRA PLCB1 e KDM4A o KDM4C	73
SAGGIO DI CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE (Co-IP)	73
MICROARRAY	74

VALIDAZIONE DEI MICROARRAY	75
SILENZIAMENTO DEI GENI TARGET	76
IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA.....	80
DISCUSSIONE	83
BIBLIOGRAFIA	91

INTRODUZIONE

EMOPOIESI

In tutti i vertebrati, il midollo osseo è un organo emopoietico. Esso costituisce il principale sito di emopoiesi nell'adulto¹ ed è prevalentemente contenuto all'interno delle cavità midollari delle ossa a struttura spugnosa (vertebre, scapole, coste, sterno, bacino, cranio ed estremità prossimali delle ossa lunghe). Nel sangue periferico circolano le così dette cellule terminalmente differenziate, che devono essere continuamente rinnovate, ossia gli eritrociti, i granulociti, i monociti, i linfociti e le piastrine. I meccanismi a ciò preposti sono l'eritropoiesi (eritrociti), la granulomonocitopoiesi (granulociti e monociti), la megacariocitopoiesi (piastrine) e la linfocitopoiesi (linfociti). I primi tre compongono la mielopoiesi, che insieme alla linfocitopoiesi costituisce l'emopoiesi. Il costante processo di rinnovamento cellulare si basa sulla presenza di una ristretta popolazione di cellule staminali emopoietiche (*Human Stem Cells*, HSC) dotate della capacità di auto-rinnovarsi e differenziare.² In condizioni fisiologiche le HSC risiedono primariamente nel midollo osseo, all'interno della nicchia staminale¹, che protegge le HSC da danni esterni e ne sostiene la sopravvivenza, la quiescenza e la capacità di auto-mantenimento.³ La capacità di auto-mantenimento delle cellule staminali emopoietiche è indispensabile per impedire il loro esaurimento nel tempo ed è basata sulla capacità di ciascuna di queste cellule di dividersi, dando origine a due cellule figlie. Una rimpiazza la cellula madre, l'altra va incontro a differenziamento e maturazione, con la produzione di cellule mature linfoidi e mieloidi. Le HSC che vanno incontro a maturazione progrediscono attraverso diversi stadi differenziativi: le cellule staminali più indifferenziate sono chiamate pluripotenti e sono in grado di dare origine a tutti gli elementi maturi, mieloidi e linfoidi, circolanti nel sangue periferico. Dalla proliferazione e differenziazione delle cellule staminali pluripotenti prendono origine le cellule staminali multipotenti che possono essere differenziate o per la mielopoiesi o per la linfopoiesi. Da quest'ultime, per ulteriore restrizione differenziativa, derivano i progenitori destinati allo sviluppo di una sola linea cellulare.² I progenitori diventando successivamente precursori di cellule linfoidi, globuli rossi, trombociti, granulociti/monociti e granulociti.⁴

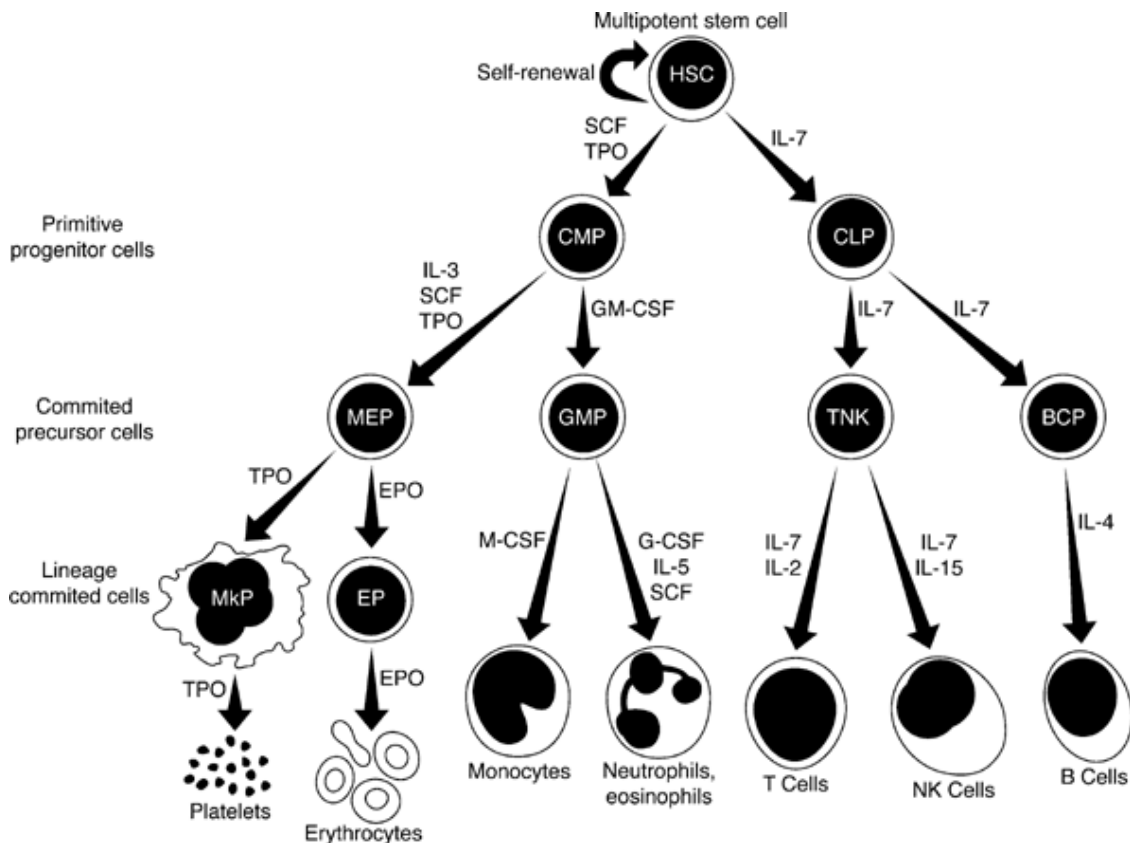


Fig.(1) *Differenziamento delle cellule emopoietiche.*⁵

LE LEUCEMIE

Le leucemie sono malattie neoplastiche monoclonali del sistema emopoietico. Esse si originano da una singola cellula staminale mutata, che può trovarsi a diversi livelli differenziativi dell'emopoiesi. In particolare essa può essere: una cellula totipotente, non ancora differenziata, in grado di dare origine sia alla linea mieloide che alla linfoide o una cellula già differenziata verso la mielopoiesi o la linfocitopoiesi. A seconda del realizzarsi dell'una o dell'altra di queste condizioni, la popolazione leucemica potrà avere differenti caratteristiche fenotipiche. Si parlerà pertanto di **Leucemie Mieloidi** (o sindromi mieloproliferative) e di **Leucemie Linfoidi** (o sindromi linfoproliferative).

Il momento critico dell'insorgenza e sviluppo di una leucemia è l'acquisizione di un vantaggio proliferativo del clone neoplastico nei confronti della normale emopoiesi. Sia le leucemie mieloidi che linfoidi presentano poi un notevole polimorfismo per quanto riguarda l'espressione delle caratteristiche fenotipiche. Responsabili di questa eterogeneità sono sia il livello differenziativo della cellula colpita dall'evento neoplastico che il mantenimento o la soppressione della capacità maturativa e differenziativa della cellula trasformata. Su quest'ultima si basa la distinzione delle leucemie mieloidi o linfoidi, in croniche e acute. Nel primo caso la leucemia è caratterizzata dalla proliferazione di cellule con caratteristiche

fenotipiche mature (leucemia cronica), mentre la leucemia acuta si esprime con un accumulo nel midollo osseo e nel sangue periferico di cellule immature o cellule blastiche.

Nel presente studio ci occuperemo in particolare della classe delle Leucemie Mieloidi Acute (LAM).

LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA (LAM)

Le leucemie mieloidi acute hanno origine da una cellula staminale, pluripotente o multipotente, già differenziata per la mielopoiesi. La trasformazione neoplastica altera i meccanismi che regolano la proliferazione e il differenziamento della cellula staminale impedendo la maturazione della sua progenie. Ne consegue un accumulo prima nel midollo osseo e poi nel sangue periferico ed in altri organi e tessuti, di cellule blastiche. I blasti leucemici sono capaci di proliferare in modo autonomo e sono parzialmente o totalmente incapaci di dare origine a cellule mature, ma mantengono alcune caratteristiche morfologiche, citochimiche e immunofenotipiche proprie della controparte normale. Si parlerà pertanto di **leucemie acute mieloblastiche, monoblastiche, eritroblastiche e megacarioblastiche**.

I. CLASSIFICAZIONE DELLA LAM

L'attuale classificazione delle LAM è stata proposta dall'organizzazione mondiale della sanità (*World Health Organization, WHO*) ed è andata a sostituire la precedente classificazione FAB (*French-American-British*). Quest'ultima si basa sulla morfologia delle cellule blastiche e identifica differenti sottotipi di LAM in base alla linea differenziativa della popolazione leucemica ed alla completa o parziale soppressione della capacità maturativa del clone neoplastico: **M0** (Leucemia minimamente differenziata); **M1** (Leucemia mieloblastica senza maturazione); **M2** (Leucemia mieloblastica con maturazione); **M3** (Leucemia promielocitica ipergranulare); **M4** (Leucemia mielomonoblastica); **M5** (Leucemia monoblastica); **M6** (Leucemia eritroblastica); **M7** (Leucemia megacarioblastica).²

La classificazione WHO, invece, si suddivide in:

- Leucemia acuta mieloide con anomalie genetiche ricorrenti, che comprende: Leucemia acuta mieloide con t(8;21)(q22;q22) (LAM1/ETO); Leucemia acuta mieloide con eosinofilia del midollo osseo e inv(16)(p13q22) o t(16;16)(q13;q22), (CBFβ/MYH11); Leucemia acuta promielocitica con t(15;17)(q22;q12), (PML/RARα) e varianti; Leucemia acuta mieloide con anomalie delle bande 11q23 (MLL);

- Leucemia acuta mieloide con displasia multilineare, che può essere: Secondaria a mielodisplasia (MDS) o MDS / sindrome mieloproliferativa (SM); Senza antecedenti MDS o MDS/MPD, ma con displasia in almeno nel 50% delle cellule di 2 o più linee mielodi;
- Leucemia acuta mieloide e sindromi mielodisplastiche, correlate alla terapia con: Agenti alchilanti o radiazioni; Inibitori della topoisomerasi II;
- Leucemia acuta mieloide (non altrimenti definita), che include: Leucemia acuta mieloide, variamente differenziata; Leucemia acuta mieloide con e senza maturazione; Leucemia acuta monoblastica / acuta monolitica; Leucemia acuta basofila; Panmielosi acuta con mielofibrosi;⁶

II. APPROCCI TERAPEUTICI ALLA LAM

Le LAM possono insorgere ad ogni età, ma la loro frequenza aumenta considerevolmente con il passare degli anni, con una età media compresa tra i 60 e i 65 anni.

La diagnosi si esegue esaminando il sangue periferico e il midollo osseo. Il quadro clinico comprende: insufficienza midollare e conseguente anemia, sviluppo di infezioni ed emorragie; infiltrazione da parte dei blasti leucemici di tessuti ed organi; sintomi generali come febbre, dolori, calo ponderale e sudorazioni profuse.

La probabilità di guarigione o di lunga sopravvivenza sono vicine al 25%, ma la prognosi, il decorso e l'approccio terapeutico da seguire sono fortemente influenzati dall'età di insorgenza.

La terapia delle LAM si basa sulla somministrazione di agenti citotossici, con lo scopo di ridurre ai minimi termini e possibilmente di eradicare la popolazione leucemica, consentendo alle cellule staminali normali residue di ripopolare normalmente il midollo. I farmaci principali sono la Citosina Arabinoside (Ara-C), e le Antracicline e similari, quali la Daunomicina, Adriamicina, Idarubicina, Mitoxantrone. Questi farmaci sono somministrati in combinazione tra di loro (polichemioterapia), a diverse dosi e con cicli di terapia di diversa durata. L'obiettivo è quello di ottenere la remissione della leucemia, ossia la scomparsa delle cellule leucemiche e la normalizzazione del quadro ematologico periferico e midollare. La remissione è il primo traguardo positivo, ma non vuol dire guarigione. Per cercare di avvicinare la "remissione" alla "guarigione", cioè di ridurre al minimo la malattia residua, la polichemioterapia viene ripetuta. Questo si definisce consolidamento o intensificazione. Al termine di questa prima fase terapeutica, fatta esclusione per i pazienti resistenti alla terapia e/o deceduti per tossicità da polichemioterapia, si aprono quattro opzioni principali: 1. Nessuna terapia; 2. Continuazione della polichemioterapia (mantenimento, o intensificazione, o reinduzione); 3. Trapianto di cellule staminali autologhe; 4. Trapianto di cellule staminali allogene;² Nonostante l'utilizzo dell'Ara-C come chemioterapico determini una risposta completa nel 65-80% dei pazienti a cui è stata diagnosticata la LAM, il risultato clinico è ancora a livelli sub-ottimali, in quanto solo il 40% di questi mostra una sopravvivenza a lungo termine e la maggior parte va incontro a

ricaduta, sviluppando resistenza al farmaco e alla successive terapie antileucemiche.⁷ La continuazione della chemioterapia peggiora la qualità di vita del paziente durante il periodo di remissione, diminuisce le probabilità di ottenere una seconda remissione e ne riduce la durata. Le conseguenze di una ricaduta sono sempre gravi. Infine per proteggere e curare il paziente dall'anemia, dalle infezioni e dalle emorragie è necessaria una terapia di supporto².

Negli ultimi anni, l'impiego crescente di alte dosi di Ara-C ha significativamente migliorato la sopravvivenza dei pazienti. Sfortunatamente, il 15-30% ancora non mostra risposta al trattamento. Inoltre, sebbene i pazienti adulti affetti da LAM che hanno ricevuto alte dosi di Ara-C mostrano una maggiore probabilità di non andare in contro a ricaduta prima di 4 anni, alte dosi sono associate a seri effetti collaterali, inclusa tossicità fatale.⁷

III. CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE (LSC)

Nonostante i numerosi progressi compiuti negli ultimi anni, la sopravvivenza dei pazienti affetti da questa neoplasia resta piuttosto bassa, intorno al 25%. La principale causa di questo insuccesso terapeutico è l'incapacità delle terapie convenzionali di eradicare il compartimento staminale leucemico che resta così in grado di ripopolare il clone leucemico.⁸ Studi sperimentali recenti hanno infatti messo in evidenza come la LAM possa originare o da una cellula staminale emopoietica divenuta leucemica in seguito a trasformazione neoplastica (LSC) o da progenitori più maturi che hanno ri-acquisito la capacità di auto-rinnovamento caratteristica delle cellule staminali.⁹ La maggior parte delle cellule leucemiche non sono in grado di proliferare estensivamente e solo una ristretta sottopopolazione cellulare con fenotipo definito (CD34⁺CD38⁻), possiede proprietà clonogeniche. Queste, chiamate *Leukemia Stem cells* (LSC), possiedono capacità differenziative, proliferative e di auto-mantenimento e sono in grado di iniziare e sostenere la crescita del clone leucemico *in vivo*.¹⁰ Le LSC condividono alcune caratteristiche con le normali HSC. Si trovano in uno stato di quiescenza del ciclo cellulare, presentano una resistenza all'apoptosi e possiedono la capacità di auto-rinnovamento.¹¹ Le HSC sembrano quindi essere il principale bersaglio della trasformazione neoplastica, rispetto ai progenitori commissionati, nella maggior parte delle LAM.¹² Analogamente al sistema emopoietico normale, anche il tessuto leucemico della LAM è organizzato in una gerarchia di classi cellulari distinte, funzionalmente eterogenee, tutte derivanti da un piccolo "pool" di LSC.¹³ Queste cellule CD34⁺CD38⁻ sono capaci di differenziare in blasti leucemici CD34⁺CD38⁺ e dare origine ad un'ampia popolazione di cellule neoplastiche mature che mancano della capacità di auto-mantenimento. La presenza quindi di una struttura gerarchica anche all'interno della leucemia mieloide acuta spiega come mai, nonostante i trattamenti attuali portino ad una remissione della malattia, vi siano frequenti casi, anche mortali, di ricaduta.

Questo perché la chemioterapia attuale è capace di colpire solo i progenitori leucemici proliferanti e non le LSC quiescenti.¹¹

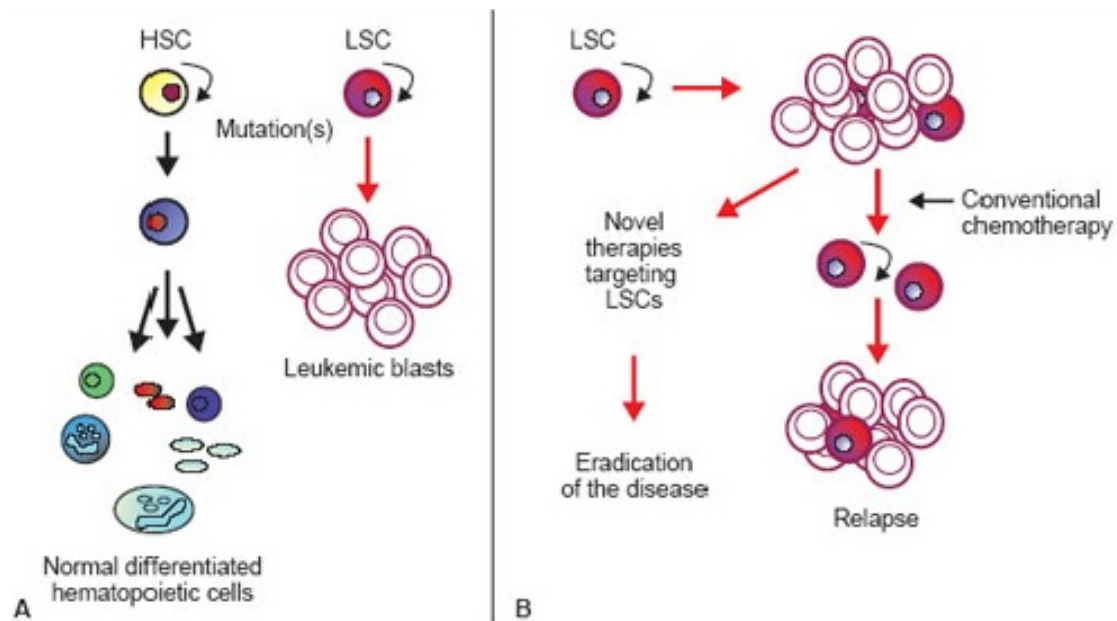


Fig.(2) Le terapie attuali convenzionali non riescono ad eradicare completamente il compartimento staminale leucemico, che è così capace di ripopolare il clone leucemico.¹⁴

In conclusione, nonostante l'alta risposta alla chemioterapia, la maggior parte dei pazienti affetti da LAM va in contro a ricaduta a causa della presenza di residui della malattia nel midollo osseo. I trattamenti attuali possono curare circa il 30% - 40% dei pazienti al di sotto dei 60 anni e approssimativamente il 10% dei pazienti sopra i 60 anni.¹⁵ A questo si aggiunge un secondo importante problema nel trattamento della leucemia e di altri tumori ematologici, l'insorgenza di una resistenza ai farmaci chemioterapici. Gli studi dei meccanismi che mediano la resistenza hanno rilevato una molteplicità di strategie utilizzate dai tumori per sopravvivere al danno citotossico. Per questi motivi la ricerca di nuove e più mirate terapie, che colpiscano anche il protetto compartimento staminale leucemico è necessaria.¹⁶

I FOSFOINOSITIDI

I. LA VIA DI SEGNALE DEI FOSFOINOSITIDI

I fosfolipidi rappresentano la classe principale di molecole costituenti il doppio strato lipidico delle membrane biologiche. Numerosi lavori hanno dimostrato come questa classe di lipidi non si limiti a svolgere funzioni strutturali, ma prende anche attivamente parte alla regolazione di numerosi processi biologici. Le molecole che fanno parte della via di segnalazione cellulare lipidica sono componenti essenziali di un processo che permette ad un segnale extracellulare di

essere trasdotto all'interno della cellula per arrivare fino al nucleo. Al suo interno, secondi messaggeri lipidici esplicano funzioni che consentono di regolare la trascrizione genica, la replicazione, la riparazione o il clivaggio del DNA, con conseguente stimolo alla proliferazione, differenziamento, apoptosi e molte altre attività cellulari.

I fosfoinositidi (PIP) sono i fosfolipidi coinvolti nella regolazione delle funzioni cellulari più studiati.¹⁷

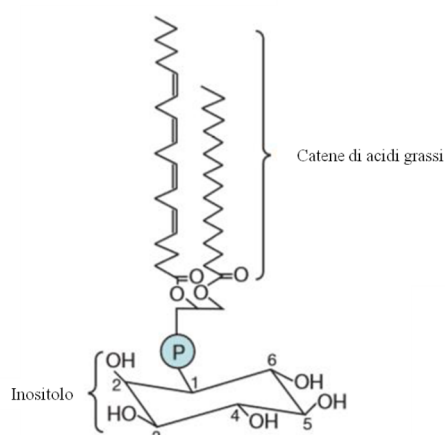


Fig.(3) *Struttura del Fosfatidilinositolo. La struttura comune dei PIP è caratterizzata dalla presenza di una molecola di fosfatidato. Essa deriva dall'esterificazione del glicerolo con due catene di acidi grassi ed un gruppo fosfato. Una delle catene è di solito un acido grasso saturo, mentre l'altro è principalmente un acido grasso insaturo. La molecola di fosfatidato lega, tramite legame fosfodiesterico, l'alcol ciclico inositolo.*¹⁸

La struttura alla base della famiglia dei PIP è una molecola di fosfatidato. Essa deriva dall'esterificazione del glicerolo con due catene di acidi grassi, a livello degli ossidrilici 1 e 2, ed un gruppo fosfato in posizione 3. Una delle catene è di solito un acido grasso saturo, mentre l'altro è principalmente un acido grasso insaturo, anche se studi recenti hanno identificato combinazioni di diverse specie di acidi grassi. La molecola di fosfatidato lega, tramite legame fosfodiesterico, l'alcol ciclico inositolo.¹⁹ Il gruppo inositide presente nella testa dei fosfoinositidi può essere rapidamente fosforilato da specifiche chinasi lipidiche.²⁰ Per ragioni steriche, la fosforilazione può avvenire soltanto a livello degli ossidrilici in posizione 3, 4 e 5. Con diverse combinazioni possono originarsi fino a sette tipologie di fosfoinositidi: **fosfatidil inositolo-3-fosfato (PI₃P)**, **fosfatidil inositolo-4-fosfato (PI₄P)**, **fosfatidil inositolo-5-fosfato (PI₅P)**, **fosfatidil inositolo-3,4-bisfosfato (PI_(3,4)P₂)**, **fosfatidil inositolo-4,5-bisfosfato**

(PI_(4,5)P₂), fosfatidil inositolo-3,5-bisfosfato (PI_(3,5)P₂) e fosfatidil inositolo-3,4,5-trisfosfato (PI_(3,4,5)P₃).¹⁹

I PIP sono i componenti più piccoli delle membrane e sono presenti in una grande varietà di organelli subcellulari (membrana plasmatica, apparato del Golgi, reticolo endoplasmatico, liposomi e il nucleo) e la regolazione dei loro livelli è indispensabile per la sopravvivenza e lo sviluppo cellulare. Questa funzione è svolta dall'attività coordinata di chinasi, fosfatasi e fosfolipasi PIP-specifiche che modulano il profilo di espressione dei PIP, all'interno dei compartimenti cellulari in risposta sia a segnali intracellulari che extracellulari.¹⁹ Viene così a generarsi un un *pattern* di fosfoinositidi che entrano a far parte di una complessa via di segnalazione che regola eventi implicati in numerosi processi (proliferazione, sopravvivenza cellulare, migrazione, traffico vescicolare).²⁰ Pertanto, una disregolazione dei PIP o delle loro molecole regolatrici può portare a gravi patologie e disordini fisiopatologici, come il cancro, le miopatie, malattie neurodegenerative, sindromi metaboliche e la sindrome di Lowe.

Le vie di segnalazione mediate dai fosfoinositidi, possono essere regolate in due modi distinti. Il primo, quello classico, in cui il PI_(4,5)P₂ è idrolizzato in seguito ad attivazione di un recettore. Vengono quindi generati due secondi messaggeri: il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP₃) che regola l'omeostasi intracellulare degli ioni calcio, con conseguente attivazione di numerose molecole implicate in diverse vie di segnalazione cellulare. Il secondo modo si esplica attraverso delle proteine che contengono un dominio di legame per i PIP. Questo legame regola la localizzazione, l'attività o la conformazione di tali proteine e di conseguenza va ad attivare una sequenziale catena di segnali a valle.¹⁹ I fosfoinositidi non solo sono substrato per la generazione di secondi messaggeri, ma svolgono a loro volta tale ruolo. Per esempio, diversi studi hanno dimostrato che i fosfoinositidi possono essere substrato di specifici domini di legame, presenti all'interno di numerose proteine: dominio PH (*pleckstrin homology*), ENTH (*epsin N-terminal homology*), dominio FYVE (*four cysteine-rich proteins*), PX (*phox homology*), dominio PHD (*plant homeodomain*) e dominio PDZ (*discs-large homologous regions*). Questi domini mostrano un'ampia eterogenicità sia per quanto riguarda la specificità per differenti fosfoinositidi che altri target.²⁰

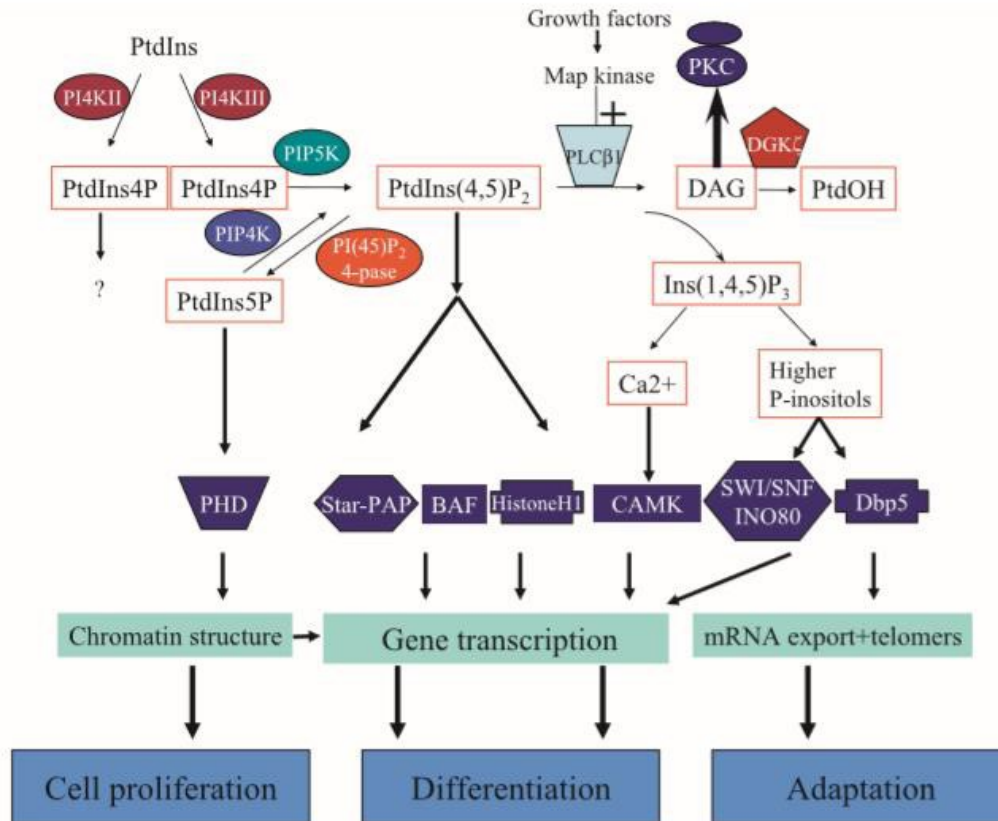


Fig.(4) I livelli dei PIP cambiano in risposta a stimoli extracellulari o intracellulari. Attraverso la diretta interazione con secondi messaggeri, attraverso la generazione di $PI_{(1,4,5)}P_3$ o l'interazione con altri effettori, il segnale è trasdotto per generare specifiche risposte cellulari.¹⁹

II. LA VIA DI SEGNALE FOSFOINOSITIDICA NUCLEARE

L'esistenza di una via di segnalazione nucleare dei fosfolipidi, distinta ed indipendente da quella citoplasmatica, è ormai affermata in letteratura. Molti meccanismi nucleari vedono la partecipazione di molecole lipidiche, dei loro prodotti metabolici o dei loro enzimi regolatori e numerosi *pathway* che si pensava fossero propri solo del citosol, sono emersi esistere anche nel nucleo. La membrana nucleare non rappresenta più una barriera alla trasduzione del segnale, ma al contrario partecipa ad un flusso di segnali dentro e fuori dal nucleo.²¹

Tra questi lipidi nucleari, sono compresi anche i fosfolipidi e soprattutto i fosfoinositidi.

Ciò che ha catturato maggiormente l'attenzione del mondo scientifico, non è tanto la loro presenza nel nucleo, ma il fatto che i loro livelli siano modulati in risposta a diversi stimoli (progressione del ciclo cellulare, danno al DNA, stress ossidativo, irradiazioni da UV, differenziamento, fattori di crescita). Inoltre è importante sottolineare come questi cambiamenti nel piccolo *pool* nucleare di PIP avvengono senza che vi siano variazioni nel più grande *pool* citoplasmatico. Questo esclude quindi la possibilità che il *pool* di PIP nucleare possa essere

semplicemente una contaminazione da parte dei PIP della membrana plasmatica, durante le procedure sperimentali.

Per tanto, questi cambiamenti nei livelli dei PIP nucleari dimostrano l'esistenza di una specifica ed indipendente via di segnalazione all'interno del nucleo, che controlla determinate funzioni nucleari, in cui i PIP rivestono un ruolo importante.

III. I FOSFOINOSITIDI NUCLEARI

Diversi studi hanno dimostrato che DAG, PI, PI₄P, PI_(4,5)P₂ e gli enzimi fosfatidil inositolo-4-chinasi (PIP₄Ks) e fosfatidil inositolo-5-chinasi (PIP₅K) sono presenti nel nucleo. Studi successivi hanno identificato come nucleari anche PI₅P, PI₃P e P_(3,4,5)P₃ e la classe 1 e 2 del fosfatidil inositolo-3-chinasi. I fosfoinositidi si localizzano sia nella porzione interna che esterna della membrana nucleare, ma anche internamente al nucleo. In particolare è stato dimostrato che PI_(4,5)P₂ e PI_(3,4,5)P₃ si posizionano principalmente negli *speckles* intra-nucleari, e sono mantenuti in questa posizione dall'interazione con proteine nucleari.

Il pool nucleare dei fosfoinositidi funziona in maniera simile alla sua controparte citoplasmatica, con alcune differenze,¹⁹ ossia che risponde a stimoli diversi (progressione del ciclo cellulare, fattori di crescita o attivazione di proteine G) da quelli che attivano i fosfoinositidi citoplasmatici.²² Infatti, molti agonisti che stimolano il metabolismo di membrana, non attivano quello nucleare e viceversa. In altri casi, se li attivano entrambi, lo fanno in maniera distinta.²³ PI_(4,5)P₂ è idrolizzato dalla fosfolipasi C nucleare (PLC), generando DAG e I_(1,4,5)P₃. A sua volta DAG incrementa i livelli e l'attività delle isoforme della protein-chinasi C (PKC) nel nucleo, che regolano eventi di trascrizione, *splicing* e rimodellamento della cromatina. I_(1,4,5)P₃ invece controlla il flusso di ioni calcio nello spazio interno del nucleo. Questi cambiamenti nei livelli di Ca²⁺, sono stati visti essere molto importanti nella regolazione dell'espressione genica.¹⁹

IV. IL DOMINIO PHD

Basandosi sul concetto che i PIP agiscono per regolare direttamente delle funzioni nucleari, ci si aspetta che specifiche proteine nucleari siano sensibili ai cambiamenti nei livelli di questo pool di PIP nucleari e traducano questi cambiamenti in differenti fenotipi.

Tra i domini che sono stati visti fungere da recettori nucleari per i PIP, rientrano i PHD (*plant homeodomain*) *zinc finger*.¹⁹ Si tratta di un motivo Cys4-His-Cys3 a dita di zinco conservato in tutto il proteoma eucariotico. I PHD *finger* sono presenti principalmente nelle proteine nucleari che regolano la cromatina²⁴ e sono coinvolti nei processi di rimodellamento della cromatina e nella trascrizione genica. Essi agiscono come motivo di legame proteina-proteina o proteina-ligando. Per esempio, possono interagire con specifici residui di lisina metilata presenti sulle code degli istoni (H3K4_{me3}), mentre il resto della proteina, contenente il dominio PHD, richiama

altri fattori di rimodellamento della cromatina. Queste proteine quindi funzionano da interpreti del codice degli istoni, traducendo le modifiche della coda degli istoni in cambiamenti nella struttura della cromatina.¹⁹

Numerosi PHD *fingers* (es. PHF6, NSD1, MYST4, BAZ1B, TAF3, CXXC1, ING3, ING4 e UHRF1) mostrano una interazione con differenti PIP, suggerendo quindi una potenziale implicazione dei PIP nucleari nella regolazione ed “interpretazione” delle modificazioni degli istoni e di conseguenza anche nei meccanismi patologici che derivano da una alterazione in questi meccanismi.²⁵ Il dominio PHD *finger* della proteina inibitore della crescita 2 (ING2) è stato uno dei primi ad essere identificato come substrato dei PIP nucleari, tra cui PI₅P.²⁴ Il legame tra il dominio PHD di ING2, un oncosoppressore, e PI₅P regola direttamente la capacità di ING2 di attivare p53 e l’espressione di geni coinvolti nella risposta nucleare al danno al DNA.²⁴

V. FOSFATIDIL INOSITOLO-4,5-BISFOSFATO NUCLEARE

Tra tutti i PIP nucleari, quello maggiormente studiato è il fosfatidil inositolo-4,5-bisfosfato, di cui sono stati messi in luce i molteplici ruoli nel nucleo e le differenti molecole con cui questo fosfoinositide interagisce. Per esempio, la localizzazione sulla cromatina del complesso di rimodellamento BAF2, implicato nella riparazione del DNA, nell’attivazione e nel silenziamento della trascrizione genica sembra essere dipendente da PI_(4,5)P₂. Quest’ultimo interagisce anche con BASP1, un repressore della trascrizione. PI_(4,5)P₂ è stato anche visto essere implicato sia direttamente che indirettamente nella regolazione dell’attività della RNA polimerasi II.²⁶ PI_(4,5)P₂ lega il C-terminale della coda degli istoni H1 e H3 opponendosi alla repressione basale della trascrizione, che è mediata dall’istone H1. PI_(4,5)P₂ inoltre interagisce direttamente con la RNA polimerasi II e potrebbe essere coinvolto nella regolazione delle fasi di trascrizione, in quanto interagisce specificatamente con la sua forma fosforilata.²⁷ Durante la trascrizione l’RNA va incontro ad una serie di modifiche post-trascrizionali, incluso il *capping*, lo *splicing* e la poliadenilazione. PI_(4,5)P₂ si localizza negli *speckles* inter-cromatinici, che sono ricchi di fattori di *splicing*. Tuttavia, come PI_(4,5)P₂ regoli effettivamente questo evento post trascrizionale non è del tutto chiaro. Ci sono anche evidenze in letteratura che la sintesi localizzata di PI_(4,5)P₂ regoli la poliadenilazione dell’RNA. In aggiunta, è stato suggerito anche un potenziale ruolo per PI_(4,5)P₂ nel trasporto dell’RNA fuori dal nucleo.^{20 28}

Un altro esempio è rappresentato dal fosfatidil inositolo-5-fosfato. E’ stato visto che la chinasi PIP4K2B e il suo substrato PI₅P, sono coinvolti nella modulazione della trascrizione di differenti geni, attraverso l’interazione diretta con TAF3, un componente del complesso di trascrizione basale. Questa interazione avviene tramite il dominio PHD *finger*. Non solo, lo stesso studio ha anche osservato che la deplezione di PIP4K2B porta ad una disregolazione di

molti più geni di quelli che vengono alterati in seguito alla sola perdita dell'interazione tra PI₅P e TAF3, suggerendo che anche altri PIP possono regolare l'espressione genica indipendentemente da TAF3.^{25 29 30 31}

PI₅P lega e attiva anche UHRF1, una proteina strettamente correlata alla modificazione dello stato dell'istone H3 e alla metilazione del DNA. Il legame di PI₅P con il dominio PHD di ATX1, costringe questa metil-trasferasi a distaccarsi dai promotori e a traslocare dal nucleo al citosol.³²

Come l'interazione tra PIP e i domini PHD regoli l'interazione con altri ligandi non è ancora del tutto stabilito. E' chiaro però che questa interazione influenza molti aspetti della modificazione della cromatina e di conseguenza dell'espressione genica¹⁹(regolazione della modificazione degli istoni,³³ legame con la cromatina³², poliadenilazione dell'RNA, regolazione dell'attività delle topoisomerasi²⁰). Molte proteine che contengono il dominio PHD sono mutate o delete nelle malattie umane e molte delle mutazioni si verificano all'interno dello stesso dominio.¹⁹

Riassumendo, i PIP si localizzano anche all'interno della componente nucleare, insieme agli enzimi responsabili del loro metabolismo. Questi sono regolati in maniera indipendente dal pool citoplasmatico e si trovano in precise regioni del nucleo. Diverse funzioni nucleari risultano essere regolate anche dai PIP.²⁰ In particolare queste vie di segnalazione dei fosfoinositidi nucleare sembrano essere coinvolte in molti aspetti dei processi epigenetici, come la lettura del codice degli istoni, il rimodellamento della cromatina, la trascrizione, la maturazione e l'esportazione dell'RNA.^{19 25} Il significato globale di questi PIP nucleari è ancora poco chiaro, soprattutto perché ancora non si conoscono nello specifico l'insieme di tutte le loro proteine effettrici e regolatorie. Tuttavia è indubbio che queste interazioni abbiano profondi effetti fisiologici e fenotipici. Pertanto, identificare nuovi effettori e molecole che interagiscono con i PIP è indispensabile per poter capire i meccanismi alla base di queste interazioni e di conseguenza capire meglio le loro implicazioni nelle diverse funzioni nucleari.²⁰

LA FAMIGLIA DELLE FOSFOLIPASI C (PLC)

Ogni classe di fosfolipasi è composta da numerosi isotipi con funzioni, domini e meccanismi regolatori distinti. Le fosfolipasi possono essere attivate da diversi segnali extracellulari, inclusi gli ormoni (insulina e ormoni della crescita), fattori di crescita (EGF e VGF) e lipidi (LPA e SIP). Questi segnali stimolano le fosfolipasi attraverso la diretta interazione con recettori tirosin chinasi (RTKs) o proteine G associate a recettori (GPCRs). I fosfolipidi vengono scissi e attivati come mediatori lipidici dalle fosfolipasi, trasmettendo quindi un segnale a numerose molecole a valle. In questo modo le fosfolipasi partecipano ad una grande varietà di processi cellulari che sono associati anche ad aspetti patologici come la tumorigenesi e/o metastasi, ossia

la secrezione delle metalloproteinasi (MMP), la riorganizzazione del citoscheletro di actina, la migrazione, la proliferazione e la crescita cellulare, infiammazione e angiogenesi.

Le fosfolipasi possono essere suddivise in tre grandi classi: fosfolipasi A (PLA), fosfolipasi C (PLC) e fosfolipasi D (PLD), che si differenziano per il tipo di reazione che catalizzano.³⁴

La fosfolipasi C riveste un ruolo centrale nella via di trasduzione del segnale. In risposta al legame di molteplici ligandi con recettori di superficie, la PLC catalizza l'idrolisi del $PI_{(4,5)}P_2$ per produrre due secondi messaggeri, ossia il DAG e l'inositolo-1,4,5- trifosfato (IP_3). IP_3 induce il rilascio di Ca^{2+} dalle riserve interne e il DAG attiva la PKC. Entrambi questi processi hanno importanti conseguenze su diverse attività cellulari, incluse la comunicazione cellula-cellula, la secrezione, la proliferazione e il differenziamento.

La famiglia delle PLC comprende 13 isoforme che possono essere suddivise in 6 tipi (ϵ , δ , γ , ζ , β , η), sulla base delle loro differenze strutturali.^{35 36}

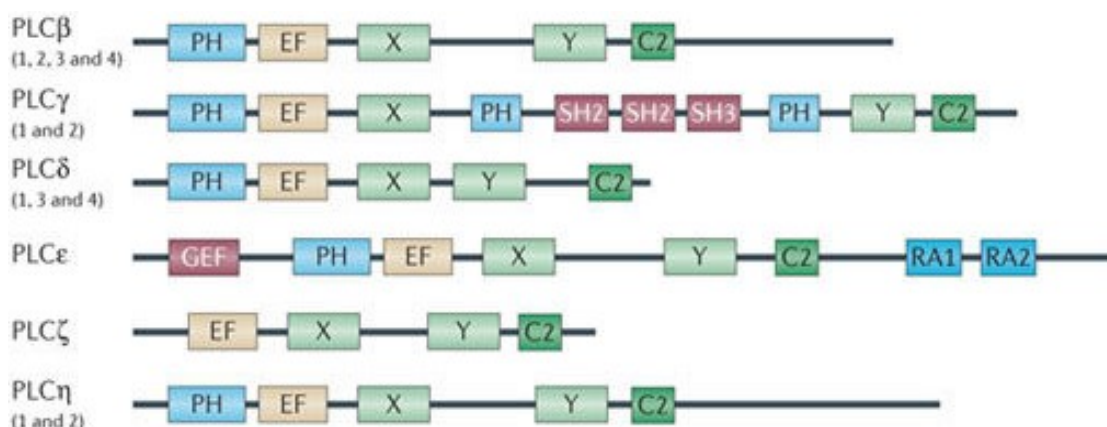


Fig.(5) Della famiglia della PLC esistono 13 isoforme, suddivise in sei gruppi (ϵ , δ , γ , ζ , β , η). I domini X e Y sono responsabili dell'attività catalitica. Alcune isoforme contengono il dominio PH (pleckstrin homology) che media il legame della PLC con differenti molecole (per esempio PIP_2 o la subunità $\beta\gamma$ della proteina G) o il dominio SH2 (SRC homology 2). Il dominio C2 che lega il calcio, regola l'attività della PLC. Allo stesso tempo il dominio a mano EF forma un legame flessibile con il dominio PH e può a sua volta essere molto importante per il controllo dell'attività della PLC.³⁴

Le varie isoforme presentano, a livello del loro sito catalitico, un alto livello di omologia, circa il 60% della sequenza amminoacidica. Il sito catalitico è composto dai domini X e Y. Inoltre, la PLC β , PLC δ e PLC γ sono caratterizzate dalla presenza di tre domini aggiuntivi. Partendo dalla regione N-terminale verso la C-terminale troviamo: il dominio *plecstrinico* (PH), formato da circa cento residui amminoacidici e coinvolto nell'interazione proteina-lipide; i domini X e Y che costituiscono il *core* catalitico; il dominio C2 che lega gli ioni calcio.³⁷

L'attivazione della PLC all'interno della membrana plasmatica, in risposta ad agonisti extracellulari, è stata ampiamente investigata. Tuttavia, l'esistenza di una via di segnalazione inositidica nucleare indipendente ha suggerito la presenza di una PLC a sua volta nucleare, che è stata dimostrata da diversi studi in letteratura.³⁵

I. ISOFORME DELLA PLC: FOCUS SULLA PLC β 1

All'interno di questa via di segnalazione inositidica nucleare indipendente il ruolo centrale è svolto dalla fosfolipasi C β 1 (PLC β 1).

La PLC β 1 è l'isoforma che maggiormente risiede nel nucleo. Essa ricopre un ruolo molto importante nel controllo della proliferazione cellulare e nel differenziamento, in quanto mediatrice dell'effetto mitogenico del fattore di crescita dell'insulina 1 (IGF1) e di conseguenza regolatrice della progressione attraverso il ciclo cellulare.³⁵ I membri della famiglia della PLC β (β 1, β 2, β 3 e β 4) sono unici in quanto possiedono esclusivamente un dominio COOH-terminale a valle del loro dominio catalitico. Questo dominio è ricco di residui di lisina e arginina conservati in tutti e 4 i membri della famiglia, che sono indispensabili per la localizzazione nucleare della PLC β .²²

II. VARIANTI DI SPLICING DELLA PLC β 1: PLC β 1a E PLC β 1b

Il gene della PLC β 1 occupa il p12,3 del cromosoma 20 ed esistono due isoforme distinte per la PLC β 1. Il trascritto va incontro a due varianti di *splicing*, da cui si generano due messaggeri, uno da 7.2 kb e il secondo da 5.4 kb. Dal primo si origina la PLC β 1b (140 kDa), e dal secondo la PLC β 1a (150 kDa).

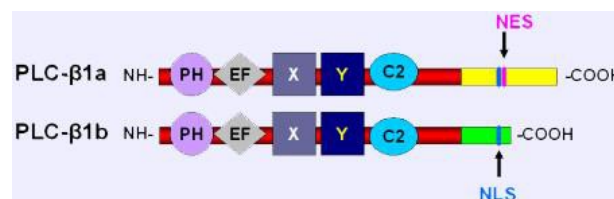


Fig.(6) Isoforme della PLC β 1 (PLC β 1a e PLC β 1b)³⁸

Entrambe le isoforme della PLC β 1 presentano, in corrispondenza della regione C-terminale, una sequenza NLS (*Nuclear Localization Sequence*) per la traslocazione nel nucleo, ma solo l'isoforma β 1a ha una porzione aggiuntiva di 43 residui amminoacidici contenente una sequenza NES (*Nuclear Export Signal*) per l'esportazione dal nucleo.³⁹ Le due isoforme della PLC β 1 sono state trovate sia nel nucleo che nel citoplasma.¹⁷ Come sia la distribuzione di questo enzima nei due compartimenti è abbastanza controversa. In letteratura si passa da una PLC β 1 totalmente nucleare a solo un 2% della PLC β 1 complessiva ad essere localizzata nel nucleo.

Questa discrepanza potrebbe essere dovuta all'esistenza delle due isoforme della PLC β 1. Per cui, mentre in alcuni tipi cellulari l'isoforma 1b è molto più espressa nel nucleo, rispetto alla 1a, in altri tipi cellulari è l'opposto.³⁵ In conclusione, è ormai stabilito in letteratura che la PLC β 1a sembra essere localizzata principalmente nel citosol, mentre la PLC β 1b nel nucleo, suggerendo che queste due isoforme possano avere ruoli distinti nella cellula. A regolare la sua distribuzione subcellulare è la fosforilazione da parte della PKC, sulla serina 887 nella regione C-terminale. Quando la PLC β 1 non è fosforilata, si localizza nel nucleo.¹⁷

III. RUOLO DELLA PLC β 1: CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE E DEL DIFFERENZIAMENTO

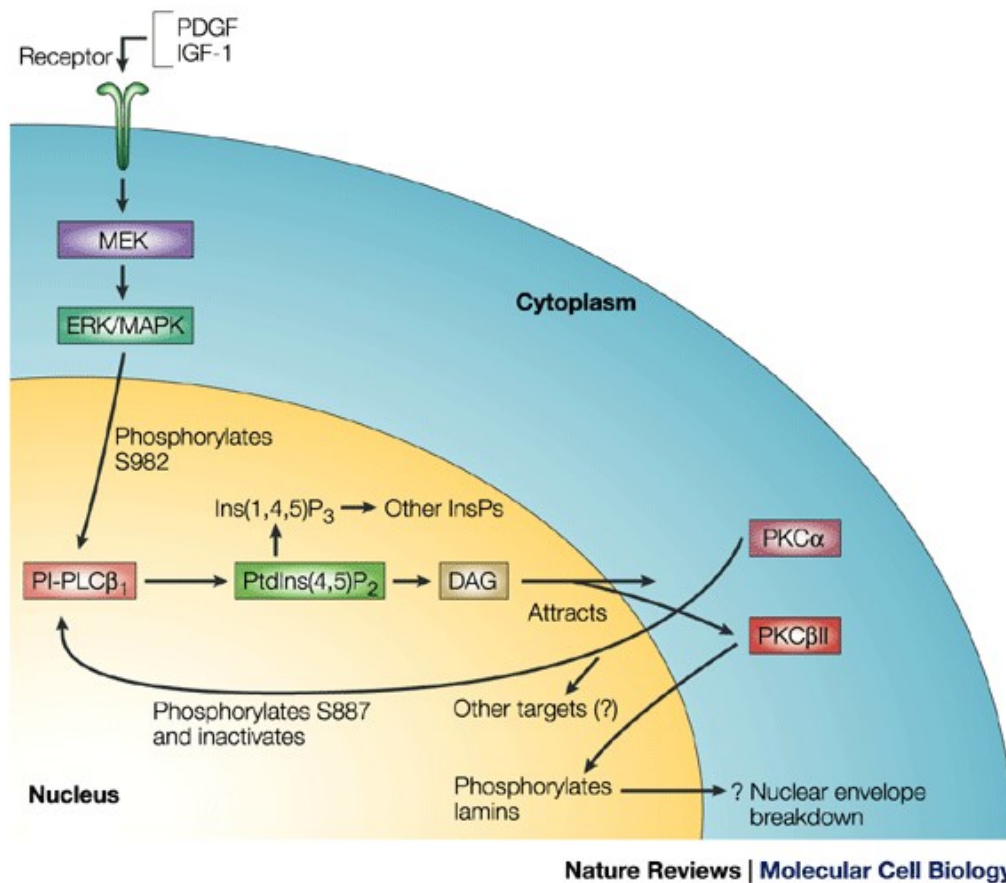


Fig.(7) PLC β 1 e la via di segnalazione fosfoinositidica nucleare: Differenti stimoli extracellulari, come il legame di fattori di crescita a specifici recettori di membrana, attivano diverse cascate di segnale che, tramite secondi messaggeri, trasducono il segnale per generare una risposta cellulare. La via di segnalazione nucleare è caratterizzata dall'attivazione da parte di stimoli differenti. Infatti l'attivazione della PLC β 1 è diversa tra il nucleo e il citoplasma. Una volta attivata, la PLC β 1 produce DAG dall'idrolisi del PI_{(4,5)P₂} nucleare.

Questo evento è collegato con differenti fasi del ciclo cellulare e porta alla traslocazione nel nucleo di alcune isoforme della PKC DAG-dipendenti (PKC α e PKC β II), capaci di fosforilare la lamina e stimolare la mitosi.⁴⁰

La via di segnalazione della PLC β 1 nucleare è essenziale per il controllo della proliferazione e del differenziamento.⁴¹

La PLC β 1 nucleare è attivata in risposta a differenti stimoli, come IGF1 e l'interleuchina 1 α (IL-1 α). La stimolazione con insulina attiva solo la PLC β 1, anche se nel nucleo sono presenti anche gli altri 3 membri della famiglia. IGF1 porta alla traslocazione delle p42/44 MAP chinasi nel nucleo che fosforilano e attivano la PLC β 1. A livello degli amminoacidi 980-983 questa fosfolipasi presenta una sequenza consenso alle MAP chinasi (pro-ser-ser-pro) che non esiste nelle altre isoforme, e questo spiegherebbe come mai l'insulina attiva solo la forma β 1 nucleare.²² Nei mammiferi la proliferazione è sotto il controllo di fattori che regolano la transizione tra differenti stadi del ciclo cellulare attraverso due principali *check-point*: il passaggio attraverso la fase G₁-S per l'inizio e il completamento della replicazione del DNA durante la fase S e la transizione tra la fase G₂-M per il controllo della mitosi. Le chinasi ciclina-dipendenti Cdk4 o cdk6, in combinazione con le cicline di tipo D (D1, D2 e D3) e cdk2 in associazione con la ciclina E svolgono un ruolo importante nel stimolare la progressione del ciclo cellulare attraverso la fase G₁, più che la transizione tra la fase G₁ e la S. Il complesso ciclina D con cdk4 o cdk6 e il complesso ciclina E con cdk2 fosforilano la proteina oncosoppressore del retinoblastoma (Rb). pRb, quando non è fosforilata, lega e sequestra il fattore di trascrizione E2F, impedendo quindi l'espressione di geni indispensabili per la fase S del ciclo cellulare. Se fosforilato, pRb rilascia E2F, che quindi è libero di promuovere la trascrizione di questi geni.⁴²

La PLC β 1 nucleare è coinvolta nel mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule, in quanto va ad opporsi all'inibizione della progressione del ciclo cellulare, necessaria per il differenziamento. La PLC β 1 svolge un ruolo centrale come *check-point* nella fase G₁ del ciclo cellulare, ed è indispensabile per il normale comportamento della cellula. L'attivazione della fosfolipasi C β 1 è direttamente responsabile dell'attivazione del complesso ciclina D3-cdk4, che stimola la progressione attraverso la fase G₁.¹⁷ La ciclina E invece non interagisce con la PLC β 1.⁴² La PLC β 1 consente anche la progressione attraverso la fase G₂/M. In seguito alla sua attivazione la PKC α è richiamata nel compartimento nucleare da parte di DAG, dove va a fosforilare la lamina B1 nell'envelope, portando al disassemblamento di quest'ultima e quindi progressione nella mitosi.^{17 43}

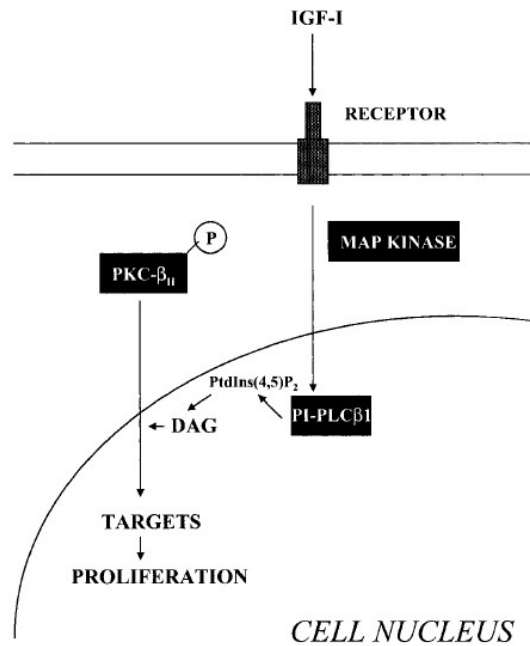


Fig.(8) La PLCβ1 nucleare svolge un ruolo essenziale per il controllo del ciclo cellulare.²³

PLC E TUMORE

Il metabolismo dei polifosfoinositidi nucleari, svolge un ruolo molto importante sia nella crescita cellulare che nel differenziamento così come in altre funzioni cellulari, come l'esporto di mRNA dal nucleo, riparazione del DNA e trascrizione genica. Di conseguenza è stato ipotizzato che possa essere coinvolto anche nella trasformazione neoplastica.¹⁷ La letteratura riporta numerosi esempi di tumori che vedono coinvolte le diverse isoforme della PLC nello sviluppo neoplastico.^{44 45} Le fosfolipasi possono influenzare processi cellulari patologici (proliferazione, migrazione, angiogenesi e infiammazione) attraverso l'attivazione di vie di segnalazioni associate a tumore, come RTK, GPCR e MAPK. Il microambiente tumorale produce differenti segnali che possono stimolare più *pathways* e pertanto diverse fosfolipasi possono essere attivate alle stesso tempo all'interno dello stesso contesto. Non solo, le fosfolipasi, distribuite lungo questo *network* di segnalazione possono interagire tra di loro e regolare le rispettive attività.³⁴

Facendo un confronto con la normale regolazione delle fosfolipasi, nei tumori la maggior parte delle PLC presentano un'espressione disregolata (in particolare iperregolata), andando quindi a modulare vie di segnalazione coinvolte nell'insorgenza o nella progressione del tumore.³⁴ Per esempio, la perdita della PLCβ3 in modelli murini può portare a disordini mieloproliferativi, linfoma o altri tipi di cancro. Nella leucemia linfocitica cronica la PLCβ3 è stata vista essere iporegolata.⁴⁶ Un calo dell'espressione della PLCδ1 è correlata ad insuccesso della cura della leucemia mieloide cronica o acuta.⁴⁷ Diversi studi hanno visto la PLCγ1 essere associata alla

regolazione dei processi di invasione cellulare e metastatizzazione.^{48 49} Nel carcinoma della mammella, la PLC γ 1 è iperespressa e ricopre un ruolo nella progressione tumorale e nella migrazione cellulare indotta dal fattore EGFR.^{44 50 51} L'iporegolazione della PLC γ 1 riduce la capacità delle cellule tumorali di invadere i tessuti nel carcinoma del seno, nel glioblastoma nel tumore della testa e del collo e riduce lo sviluppo di metastasi nei polmoni.^{52 53} Le isoforme appartenenti alla famiglia delle PLC β , possono essere attivate da GPCRs, il che significa che molte chemochine secrete nel microambiente tumorale, possono attivare le PLC β per stimolare la migrazione e l'invasione cellulare.³⁴ La PLC δ 4 è stata vista essere iperegolata in alcuni tumori del seno, e la sua iperespressione sembra incrementare la capacità proliferativa delle cellule tumorali meno tumorigeniche.⁴⁵ Membri della sub-famiglia delle PLC γ sono stati visti essere iperegolati nei leucociti neoplastici⁵⁴ e nel carcinoma del colon, insieme alla PLC β 1 e δ 1 dove ricoprono un ruolo centrale nella cancerogenesi.^{55 56} Inoltre, le isoforme della PLC δ sono state trovate essere coinvolte nell'evoluzione neoplastica della mucosa gastrica e delle cellule del fegato.⁵⁷ La PLC β 2 è iperespressa nella maggioranza dei tumori del seno e i suoi livelli sono correlati a insuccesso della terapia. La PLC β 2 promuove la migrazione cellulare, induce la transizione dalla fase G₀/G₁ e dalla fase S/G₂/M del ciclo cellulare, che sembra essere un evento critico per la progressione tumorale.^{44 45} Inoltre, le isoforme della PLC β sono frequentemente associate a tumori neuroendocrini, malattie emopoietiche e MDS.⁵⁸

I. PLC COME BERSAGLIO FARMACOLOGICO

La disregolazione delle fosfolipasi rappresenta un importante bersaglio terapeutico.³⁴ Considerato che la prevenzione della crescita tumorale e l'induzione del differenziamento rappresentano importanti bersagli di farmaci anti-neoplastici, ulteriori studi sotto il profilo fisiologico e patologico stanno diventando sempre più necessari.⁴⁸ In particolare è indispensabile correlare l'espressione di ogni specifica isoforma della PLC alla sua funzione cellulare e anche trasformazione tumorale, con lo scopo di capire la fisiopatologia della malattia. Questo andrebbe ad aprire la possibilità di usare le isoforme della PLC come promettenti bersagli terapeutici.⁵⁸ Tuttavia, la strada da percorrere è ancora molto lunga. Il ruolo funzionale di tutte le fosfolipasi, in condizioni patologiche non è ancora stato ben definito e ancora non sono state identificate mutazioni che possono attivarle costitutivamente in uno specifico tessuto, portando quindi a tumore. Inoltre, le fosfolipasi, interagiscono con numerose molecole e vie di segnalazione associate a tumore.

LA CROMATINA

Nel nucleo il genoma è impaccato all'interno di una struttura chiamata cromatina. L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, un motivo ripetuto costituito da un ottamero di istoni attorno al quale il DNA si avvolge 1,7 volte per una lunghezza di 147 bp. L'ottamero è composto da due subunità di ciascun istone H2A, H2B, H3, H4. L'istone H1 si posiziona al di sopra del nucleo di istoni e copre circa 15 bp di DNA. L'N-terminale di questo *core* di istoni si sporge all'esterno ed è soggetto a numerose modificazioni che regolano la struttura della cromatina, la sua accessibilità e le sue funzioni.¹⁹ La struttura della cromatina è responsabile di una "memoria" che si mantiene durante la divisione cellulare e si pensa sia la principale forma di regolazione epigenetica dell'espressione genica.⁵⁹

La cromatina forma una struttura repressiva altamente organizzata, che limita i processi cellulari che richiedono accesso alla sequenza di DNA. Il rimodellamento della cromatina è la conseguenza di due meccanismi. Il primo sono modifiche degli istoni del nucleosoma, che includono la fosforilazione, l'acetilazione, la metilazione e l'ubiquitinazione da parte di enzimi, che direttamente o richiamando altre proteine traducono queste modifiche in risposte cellulari.⁶⁰

Il secondo meccanismo utilizza l'energia dall'idrolisi dell'ATP per alterare la struttura della cromatina. I due processi non si escludono a vicenda, ma possono collaborare tra di loro.^{61 62} Le modificazioni della cromatina associate ad un particolare locus e i suoi elementi regolatori, giocano un ruolo importante nel determinare lo stato finale di attivazione o di repressione di un gene.⁶³ Queste modificazioni chiamate modifiche epigenetiche o stati epigenetici possono essere divisi in quattro categorie: **modificazione dei residui degli istoni, metilazione del DNA, microRNA** e altri **RNA** che possono cambiare i livelli dell'mRNA target, prima della traduzione.⁶⁴ Questo rimodellamento dinamico degli istoni, assicura una appropriata espressione genica durante la divisione cellulare e lo sviluppo dell'organismo.⁶⁵

Il controllo della trascrizione genica mediante modificazioni della struttura della cromatina, coinvolge diversi gruppi di proteine, raggruppate in due grandi famiglie: la famiglia delle TrxG (*trithorax group*) e la famiglia delle PcG (*polycomb group*), che sembrano avere funzioni opposte. La metilazione dell'istone H3, sul residuo di lisina 4 (H3K4) da parte di alcuni membri del gruppo delle TrxG è spesso associata a regolazione positiva dell'espressione genica. Mentre la metilazione dell'istone H3 sul residuo di lisina 27 (H3K27) da parte della famiglia delle PcG reprime la trascrizione.⁵⁹

Tra le molecole epigenetiche importanti nella regolazione della trascrizione, sia durante lo sviluppo normale che patologico, ci sono le proteine metiltrasferasi (PMTs), di cui fanno parte le lisine metiltrasferasi (KMTs) e le arginine metiltrasferasi (PRMTs).⁶⁶ La metilazione / demetilazione delle lisine è molto importante sui residui di lisina degli istoni H3K9, H3K27 e H3K36.⁶⁴ La metilazione dell'istone H3K27_{me3} è un marchio di repressione genica diffuso in

tutto il genoma. Mentre, la metilazione di H3K9_{me3} è un marchio di repressione della trascrizione localizzato solo in due regioni genomiche specifiche, che corrispondono principalmente ai geni tardivi.⁶⁷ L'acetilazione dell'istone H3K9 porta ad una maggiore accessibilità della cromatina e quindi ad attivazione della trascrizione genica. In contrasto, la sua metilazione è associata ad uno stretto impaccamento di quest'ultima (eterocromatina) e quindi a repressione genica. La maggior parte delle modificazioni degli istoni avvengono sulla porzione esposta della coda N-terminale. Al contrario, la metilazione di H3K79 è l'unica che si localizza sulla superficie del *core* del nucleosoma.⁶⁵

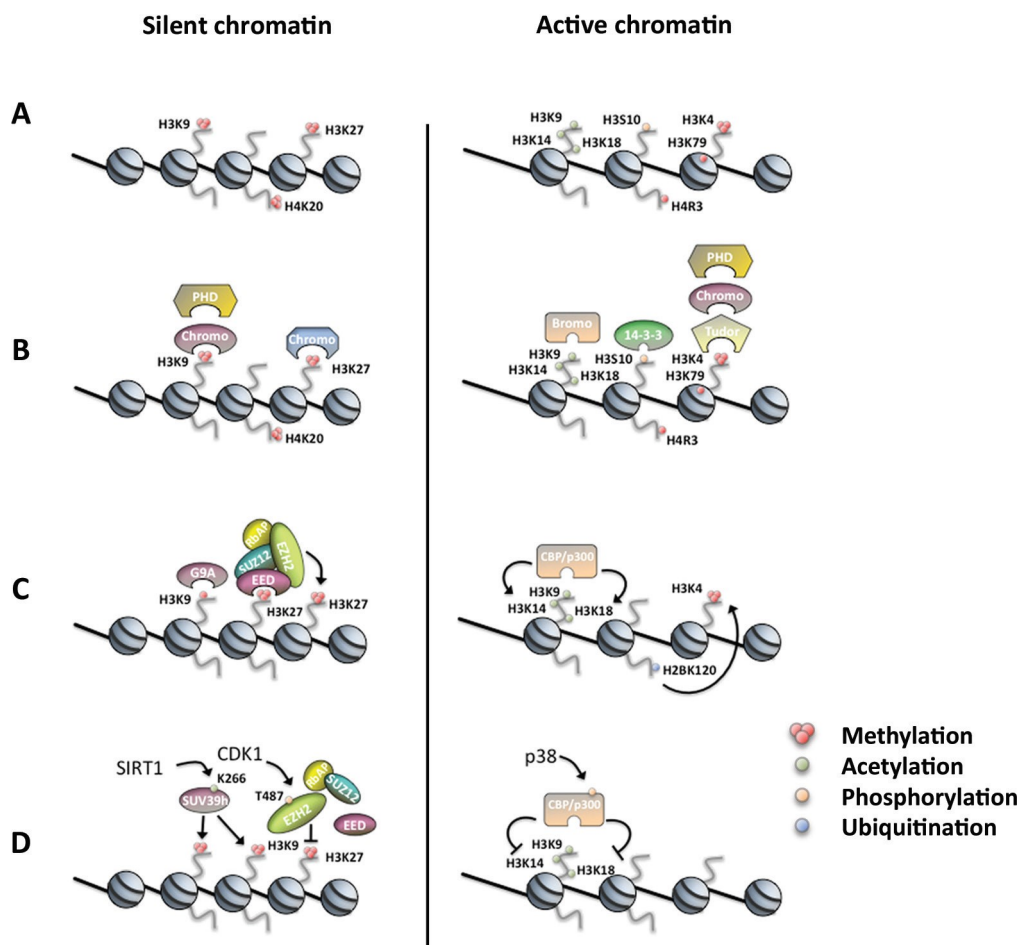


Fig.(9) Le modificazioni post traduzionali, come per esempio l'acetilazione, la metilazione, la fosforilazione o l'ubiquitinazione, controllano la trascrizione genica mediante modificazioni della struttura della cromatina. A) Specifiche modificazioni post traduzionali degli istoni possono modulare sia lo stato di attivazione sia di silenziamento della cromatina. B) Queste modificazioni possono alterare direttamente l'interazione tra il DNA e i nucleosomi e/o mediare il legame con determinati fattori capaci di interpretare il "codice" degli istoni. C) Queste modificazioni possono inibire o promuovere il legame di specifici enzimi modificatori degli istoni. Per esempio, il legame di EED (proteina appartenente al polycomb group), che fa parte

del complesso PCR2, con l'istone H3K27_{me3} stimola l'attività metiltrasferasica di EZH2 sulla lisina 27 della coda dell'istone H3 adiacente. D) Le modifiche post traduzionali possono modificare e di conseguenza regolare l'attività degli enzimi modificatori degli istoni. Per esempio l'istone deacetilasi SIRT1 stimola l'attività enzimatica di SUV39, una metiltrasferasi, attraverso la sua deacetilazione sul residuo K266.⁶⁸

Essendo i principali modificatori dello stato della cromatina, questi fattori epigenetici controllano un ampio spettro di processi biologici, incluso il differenziamento delle cellule staminali e l'oncogenesi.⁶⁷ Alterazioni nella loro funzione spesso porta a espressione genica aberrante che può evolvere nello sviluppo tumorale.⁵⁹

Da letteratura, l'ambito maggiormente studiato riguarda il coinvolgimento di questi regolatori epigenetici nelle malattie emopoietiche. Nel caso della LAM, una significativa proporzione di pazienti sviluppa mutazioni nonsense nei regolatori epigenetici, con il 44% di essi che presenta una mutazione associata a metilazione del DNA.

La frequenza con cui incorrono mutazioni a livello dei regolatori epigenetici, insieme con la loro specificità tissutale e della patologia, rende il controllo dell'epigenoma un attraente bersaglio per il trattamento del cancro.⁶³

MLL (mixed lineage leukemia)

All'interno della famiglia delle TrxG troviamo la proteina MLL (*mixed lineage leukemia*).

Il gene MLL è l'omologo umano della *Drosophila melanogaster trithorax*, si trova sul cromosoma 11q23,⁵⁹ ed è indispensabile per la trascrizione dell'1,8% dei geni nei mammiferi.⁶⁹

Si tratta di una metil-trasferasi coinvolta nella regolazione positiva dei geni HOX e nella metilazione dell'istone 3 lisina 4 (H3K4).⁵⁹ MLL interagisce con i promotori dei geni appartenenti al gruppo HOX, l'interazione non inizia la trascrizione, ma è responsabile del suo mantenimento.⁷⁰

MLL è una proteina espressa nelle cellule emopoietiche in modo ubiquitario, incluse le cellule staminali e i progenitori emopoietici. Contiene nell'N-terminale, tre domini uncino AT, seguiti da due motivi di localizzazione nucleare (SNL1 e SNL2); un motivo di repressione della trascrizione contenente un CxxC *zinc-finger*, che è omologo al dominio della DNA metiltransferasi 1 (DMT); molteplici *plant homeodomain* (PHDs) situati all'N-terminale del dominio di attivazione della trascrizione (AT), che hanno la funzione di richiamare la proteina di legame CREB (CBP), una istone acetil-trasferasi responsabile di repressione genica; un dominio SET, localizzato al C-terminale, che metila H3K4 e quindi determina iporegolazione della trascrizione.⁷¹

MLL fa parte di un più ampio complesso nucleare, che include molte proteine e diverse funzioni. MLL lega il DNA in modo non sequenza-specifico, attraverso il suo dominio uncino AT e il dominio DMT.⁷² Nonostante MLL possieda dei domini che le consentirebbero di interagire direttamente con il DNA, di solito questa interazione è influenzata anche da altre proteine che a loro volta legano il DNA, come per esempio le menine (MEN1).^{73 74} Questa proteina oncosoppressore interagisce insieme a MLL con il promotore del gene HOXA9. In assenza di MEN1 o nel caso di mutazioni, la proteina MLL fallisce nella regolazione di HOXA9, portando a trasformazione neoplastica. Oltre ai sopracitati geni HOX, MLL ha anche altri target. Da letteratura è associata a centinaia di promotori, suggerendo per questa proteina un ruolo molto complesso e globale nella regolazione della trascrizione.⁷⁵

I. MLL E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

Il gene MLL è spesso implicato in traslocazioni cromosomiche che si ritrovano in una grande varietà di malattie ematologiche, specialmente nella leucemia acuta mieloide, leucemia acuta linfoblastica, leucemia biofenotipica e le sindromi mieloidisplastiche. Le traslocazioni MLL sono presenti nella maggior parte delle leucemie infantili (70%), nel 10% di quelle dell'adulto⁵⁹ e nelle leucemie secondarie dopo trattamento con inibitori delle topoisomerasi. I bambini diagnosticati con la LAL che presenta traslocazione del gene MLL, rispondono poco alle correnti chemioterapie e hanno una prognosi sfavorevole con sopravvivenza inferiore al 50%.⁷⁶ Per quanto riguarda la LAM, la presenza di riarrangiamento è una delle forme leucemiche più aggressive. Complessivamente, la traslocazione del gene MLL è caratteristica del 10% delle leucemie umane.⁵⁹ La traslocazione MLL, è probabilmente dovuta al fallimento della riparazione di una doppia rottura del DNA, durante lo sviluppo delle cellule emopoietiche.⁷⁷ A questo segue solitamente un riarrangiamento per cui viene prodotta una proteina chimerica, in cui l'N-terminale di MLL si fonde con il C-terminale di un altro partner. Tutti gli MLL di fusione fino ad ora identificati, contengono i primi 8-13 esoni del gene MLL e un numero variabile di esoni provenienti dal partner di fusione (FPG).⁷⁸ Quindi, mentre i domini AT e CxxC *zinc-finger*, sono mantenuti e sono entrambi essenziali per la capacità di trasformazione neoplastica della proteina MLL traslocata, il dominio SET viene perso. La mancanza di quest'ultimo comporta l'incapacità di metilare l'istone H3K4 e di indurre repressione genica, mentre la capacità di regolare positivamente la trascrizione dei geni HOX, così come di altri geni è conservata.⁷⁹

La proteina di fusione MLL, sembra attivare un programma di espressione genica leucemica attraverso più di un meccanismo, in base al suo partner di fusione e al pattern di espressione genica che ne consegue.⁶⁹

Per il gene MLL sono stati identificati più di 50 partner di fusione. Tra questi i 5 riarrangiamenti più frequenti (80%) sono t(9;11) (p22;q23) o **MLL-AF9** ; t(4;11) (q21;q23) o

MLL-AF4 ; t(11;19) (q23;p13.3) o **MLL-ENL** ; t(10;11) (p12;q23) o **MLL-AF10** ; t(6;11) (q27;q23) o **MLL-AF6**, tutti coinvolti sia nel controllo della trascrizione che nella fase di allungamento. I più comuni, AF4, AF9 e ENL, contengono infatti al C-terminale dei domini di attivazione della trascrizione, che sono mantenuti nel riarrangiamento con MLL e che sono stati visti essere importanti per l'oncogenesi.⁵⁹

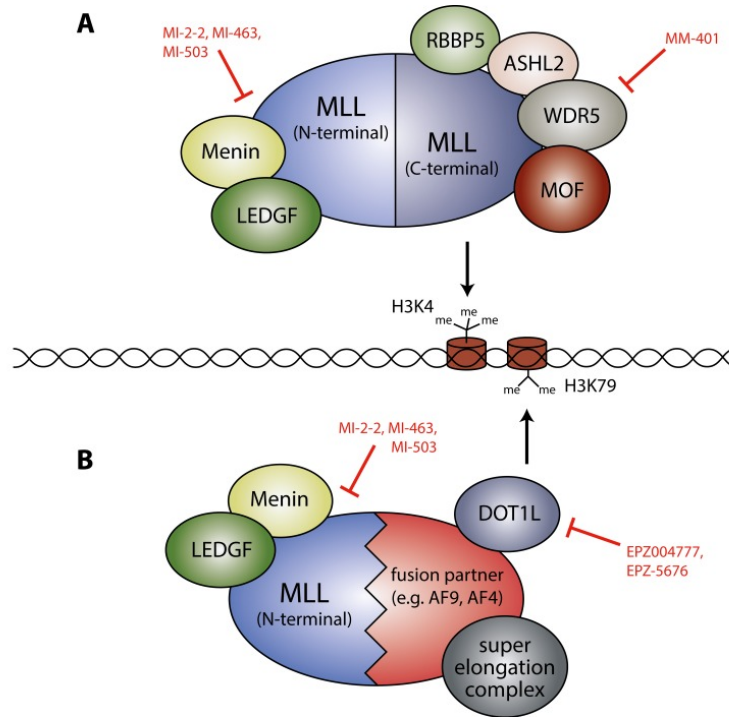


Fig.(10) A) La Proteina MLL è associata, all' N-terminale, con diverse proteine come LEDGF (*Lens epithelium-derived growth factor*) e le menine. Nella porzione C-terminale interagisce con RBBP5 (*Retinoblastoma-binding protein 5*), ASH2L (*componente del complesso Set1/Ash2 istone metiltrasferasi*), WDR5 (*WD repeat-containing protein 5*) e MOF una istone acetiltrasferasi. Il dominio SET catalizza la metilazione dell'istone H3K4. B) La porzione N-terminale della proteina di traslocazione MLL è fusa con differenti partner, che sono capaci di richiamare altri cofattori come per esempio DOT1L. La metilazione dell'istone H3K79 ($H3K79_{me2}$) da parte di DOT1L è indispensabile per il mantenimento dell'elevata espressione dei geni bersaglio della proteina di fusione MLL.⁸⁰

II. MLL-AF9 E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

La traslocazione MLL più frequente nella LAM è quella che origina l'oncogene MLL-AF9, ossia t(9;11)(p22;q23), che è spesso associata a fenotipo monocitario (AML-M5, secondo la classificazione FAB). MLL-AF9 induce eccessiva mieloproliferazione, ma sono comunque necessarie mutazioni secondarie perché la cellula vada incontro a completa trasformazione in

blasto leucemico.⁸¹ Da letteratura, modelli di topi *knock-in*, che esprimono costitutivamente MLL-AF9, sviluppano la LAM con una lunga latenza, presumibilmente perché sono richiesti eventi genetici successivi perché avvenga la trasformazione leucemica.⁸² Se invece il gene MLL viene semplicemente troncato dopo l'esone 8, questa delezione non è capace di indurre leucemia, neanche in seguito a lunga latenza, ma è richiesta la porzione C-terminale di AF9 perché ciò si verifichi.⁸³ Inoltre studi condotti su modelli murini hanno dimostrato che l'espressione di MLL-AF9 in tutte le cellule che normalmente esprimono la forma normale della proteina MLL, porta solo all'insorgenza di tumori emopoietici. Questo suggerisce che la proteina di fusione MLL può essere tumorigenica solo nelle cellule emopoietiche.⁵⁹ L'espressione di MLL-AF9 porta all'iperespressione dei geni HOXA4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11 e del cofattore MEIS1 ed è la cooperazione tra tutti questi elementi che è responsabile dell'induzione del processo leucemico nei progenitori emopoietici.^{84 85 86} Uno studio recente ha visto come nelle THP-1 (che esprimono MLL-AF9) i geni HOXA4, 7, 10 e 11 insieme a MEIS1 siano iporegolati nelle THP-1 differenziate, suggerendo un ruolo chiave di questi geni nel blocco del differenziamento terminale all'interno della cellula leucemica indotto da MLL-AF9. L'iporegolazione della proteina di traslocazione MLL-AF9 nelle THP-1 induce una forte inibizione della proliferazione dei blasti leucemici.⁸¹

La trasformazione leucemica da parte di MLL-AF9 promuove un programma di espressione genica associato ad auto-rinnovamento cellulare aberrante, che coinvolge in particolare il gene HOXA9 e il suo cofattore MEIS1.⁷⁷ Come menzionato precedentemente, le cellule leucemiche esistono in uno stato gerarchico nel quale solo una piccola frazione è capace di auto-rinnovamento e sono queste le cellule capaci di iniziare e mantenere il clone leucemico, ossia le cellule staminali leucemiche (LSC). Le LSC potrebbero derivare da normali HSC che hanno acquisito un potenziamento nella loro capacità di auto-rinnovamento attraverso mutazioni / trasformazioni aggiuntive o alternativamente da progenitori già commissionati che hanno riacquisito la capacità di auto-rinnovarsi. Visto il ruolo dei geni HOX nel *self-renewal* delle HSC, la disregolazione di questi geni potrebbe essere il meccanismo centrale tramite il cui le LSC si riappropriano di questa capacità. In letteratura è dimostrato che progenitori ematopoietici già differenziati, con bassa capacità di *self-renewal*, se ingegnerizzati per iperesprimere MLL-AF9 possono trasformarsi in LSC.⁸⁷

III. I GENI HOX

Studi recenti hanno dimostrato l'esistenza e l'importanza, all'interno delle cellule staminali emopoietiche (HSC), di un programma di espressione genica MLL dipendente, che ha come elemento centrale i geni HOX. Quest'ultimi, positivamente regolati da MLL, sono dei fattori di trascrizione che partecipano allo sviluppo di diversi tessuti, incluso il sistema emopoietico.

MLL ricopre un ruolo cruciale nel controllo dei geni HOX e di conseguenza nello sviluppo del sistema emopoietico dei mammiferi.⁵⁹

La famiglia dei geni HOX o geni *homeobox*, è composta da un insieme di geni estremamente conservati, che codifica per fattori di trascrizione che legano il DNA.

Nei mammiferi ci sono 39 geni HOX organizzati in 4 cluster genomici o gruppi omologhi (A-D), localizzati su 4 diversi cromosomi.⁸⁷

L'attivazione ordinata e strettamente regolata dei geni HOX umani è essenziale sia per la regolazione della normale embriogenesi, che per la normale e definitiva emopoiesi. Alterazioni nell'ordine di attivazione e inattivazione di questi geni porta a fallimento dell'emopoiesi.⁷⁰ Durante lo sviluppo, i geni HOX seguono un pattern di espressione sia temporale che spaziale, per cui i geni HOX al 3' sono espressi prima nell'embrione e nelle regioni anteriori, mentre i geni HOX al 5' sono espressi in stadi successivi e in regioni posteriori. La stretta regolazione dei geni HOX è la somma dell'attività di diversi fattori, inclusi i regolatori epigenetici. In quest'ultimo gruppo fanno parte le istone metil-trasferasi *trithorax* (TrxG) e la famiglia delle *polycomb group* (PcG), che rispettivamente attivano e reprimono la trascrizione.⁸⁸

La maggior parte dei geni HOX del cluster A, B e C sono espressi nelle cellule emopoietiche, preferenzialmente nelle cellule staminali ematopoietiche e nei progenitori immaturi, mentre sono silenziati durante il differenziamento e la maturazione.⁸⁷ La loro espressione nell'emopoiesi, prevede che quelli anteriori (HOX1-6) siano espressi prima nei progenitori non commissionati, mentre i posteriori (HOX7-13) sono espressi nelle cellule CD34+ commissionate per la linea mieloide ed eritroide. Quando le cellule diventano completamente mature e perdono la positività al CD34, l'espressione dei geni HOX è silenziata. Tuttavia alcuni membri del cluster A, B e C sono importanti regolatori anche dell'emopoiesi dell'adulto.⁸⁸

I fattori di trascrizione HOX legano il DNA target con ridotta selettività. Sono i cofattori di questi geni, MEIS1 e PBX1, che interagendo direttamente con le proteine HOX, incrementano la loro affinità e specificità di legame con il DNA. Contrariamente a MLL, che ricopre un ruolo non ridondante nell'emopoiesi definitiva, i geni HOX, mostrano ridondanza genica e meccanismi compensatori tra di loro, così come interazione e *cross-talk*.⁸⁷ HOXB4 è tra tutti i geni HOX quello maggiormente espresso nelle cellule emopoietiche primitive ed è stato dimostrato che una sua *up*-regolazione è sufficiente a stimolare l'espansione delle HSC *in vivo* ed *ex vivo* senza però promuovere la leucemia.⁸⁹ Anche altri geni HOX sono stati visti essere potenti stimolatori dell'espansione delle HSC e questo ha messo in luce il loro importante ruolo nei meccanismi di auto-rinnovamento (*self-renewal*) di quest'ultime. Tra tutti i geni HOX, HOXA9 ha un ruolo chiave nelle prime funzioni delle HSC, in quanto è preferibilmente e maggiormente espresso in questo compartimento cellulare ed è iporegolato durante il

differenziamento.⁸⁷ Diversi studi hanno dimostrato che HOXA9 potrebbe essere il principale responsabile della capacità delle HSC di auto-rinnovarsi. Modelli murini in cui HOXA9 è deletato, mostrano alterazioni in più linee emopoietiche e in particolare la perdita della capacità da parte delle HSC di ripopolarsi. Queste evidenze sono rinforzate anche dal fatto che esperimenti *in vivo* mostrano come l'iperespressione di HOXA9 stimoli la rigenerazione delle HSC, anche se a questo evento si vanno a sommare altre alterazioni del differenziamento cellulare che alla fine portano all'insorgenza della leucemia.⁹⁰

IV. I GENI HOXA E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

Dato il ruolo chiave dei geni HOX nelle cellule emopoietiche immature e nelle HSC, una disregolazione della loro espressione può promuovere la trasformazione leucemica.

L'iperespressione dei geni HOX in modelli murini è stato visto avere potenti effetti sul differenziamento e sulla proliferazione cellulare. Per esempio l'iperespressione di HOXA10, HOXB3 e HOXB6 nei topi induce un blocco nel differenziamento delle cellule B e T, un danno nell'emopoiesi, l'induzione di disordini mieloproliferativi e infine leucemia.⁸⁷ Il ruolo centrale dei geni HOX nelle malattie emopoietiche è supportato dalla frequente osservazione di una espressione genica elevata dei geni HOX, soprattutto i geni 5'-HOXA (HoxA5-11)⁷⁶ e di MEIS1 nelle leucemie, in particolare nella LAM. La disregolazione dei geni HOX è stata documentata anche nella LAL.⁸⁷ Per esempio, mentre la trascrizione dei geni HOXA7, 9 e 10 è avviata in modo coordinato nelle HSC, la perdita di una normale iporegolazione di questi geni durante la maturazione mieloide, è spesso documentata nella LAM, dove i geni HOXA da 7 a 11 sono iperregolati in blocco. Anche l'espressione di HOXB3 e 4 è stata vista aumentare nei campioni di midollo osseo da paziente leucemico. Nelle CD34-, da soggetto sano, i livelli di espressione di HOXA9, HOXA10, HOXB3 e HOXB4 sono significativamente più bassi rispetto ai livelli nelle cellule mature CD34+CD38-. Al contrario, nei campioni provenienti da midollo osseo di pazienti leucemici, non ci sono differenze e soprattutto l'espressione di questi geni è significativamente più alta rispetto ai pazienti sani, sia che si tratti di CD34- che CD34+.⁷⁰ L'iperespressione di determinati geni HOX come HOXA9, HOXA10, HOXB3, HOXB6 o HOXB8 conferisce alle cellule un vantaggio nella crescita e porta a una lunga latenza della leucemia, per la quale sono necessarie altre alterazioni genetiche affinché si abbia la comparsa definitiva del fenotipo leucemico. Infatti, la coiperespressione di MEIS1 collabora con tutti i geni HOX citati, incluso il non leucemogenico HOXB4, per indurre una rapida insorgenza della LAM.⁸⁷ In letteratura è anche riportato che nelle cellule staminali leucemiche, l'espressione dei geni HOXA5, HOXA10 e in particolare HOXA9 è immediatamente indotta in seguito all'espressione della proteina di traslocazione MLL-AF9.⁷⁶

V. HOXA9 E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

HOXA9 può sia attivare, che reprimere l'espressione genica. La specificità di legame di HOXA9 con il DNA è raggiunta tramite una combinazione di interazioni con cofattori e collaborazione con altre proteine insieme ad una accessibilità della cromatina.⁸⁸ La proteina metiltrasferasi MLL, regola positivamente l'espressione di HOXA9 andando a trimetilare l'istone 3 sulla lisina 4 a livello del suo promotore (H3K4_{me3}).⁹¹ Questa attività è direttamente antagonizzata dall'attività del complesso repressivo *polycomb group* PRC1 e PRC2, responsabile della trimetilazione dell'istone 3 sulla lisina 27 (H3K27_{me3}).⁹²

HOXA9 sembra giocare un ruolo importante nella normale biologia delle HSC. Quando HOXA9 è soppresso, le HSC mostrano sia una compromissione della capacità proliferativa in risposta alle citochine, sia un danneggiamento della capacità di ripopolare il pool originario. Diverse alterazioni a monte possono portare alla disregolazione di HOXA9: traslocazione del gene MLL, fusione con il gene NUP98, mutazione del fattore NPM1c o una alterazione nella regolazione di CDX.⁸⁸ HOXA9 è iperespresso in più del 50% delle LAM (raggiungendo i 2 – 8 *fold change* di espressione, rispetto ai controlli sani ed è strettamente associato a prognosi negativa.⁹³ La deplezione di HOXA9 nei campioni primari da paziente affetto da LAM, induce un immediato arresto della capacità proliferativa dei blasti leucemici, differenziamento e successiva progressiva induzione di apoptosi. Non solo, recenti studi di espressione genica hanno rivelato una stretta correlazione tra la soppressione di HOXA9 e la conseguente iporegolazione di un pattern di geni già dimostrato essere iperespresso nella LAM con traslocazione MLL, ossia geni appartenenti al cluster 5'-HOXA, i cofattori di HOXA9, MEIS1 e PBX3 e il fattore di trascrizione MEF2C.⁷⁶

L'insieme di queste evidenze, va a supportare ulteriormente il potenziale ruolo di HOXA9 come elemento centrale della via di segnalazione leucemogenica innescata dalla traslocazione del gene MLL, che contribuisce sia all'induzione che al mantenimento di un programma di espressione genica inappropriato. HOXA9 quindi sembra essere indispensabile per la sopravvivenza dei blasti leucemici. Non solo, mentre per altri geni appartenenti al cluster degli HOX è stata proposta una ridondanza funzionale, per quanto riguarda HOXA9, non sembra esserci questo meccanismo compensatorio. La soppressione di HOXA9 non è bilanciata da altri fattori per il mantenimento della proliferazione e sopravvivenza cellulare.^{85 94} Per questo motivo, il *knock-down* della maggior parte dei geni HOXA in modelli murini, porta solo a un fenotipo emopoietico debole. Al contrario, se HOXA9 viene deletato, si manifesta un fenotipo emopoietico molto più drammatico. In sintesi, la proteina di fusione MLL attiva in maniera costitutiva l'espressione di HOXA9, che è condizione sia necessaria che sufficiente per il mantenimento della trasformazione leucemica. Tuttavia, perché si abbia una progressione a LAM sono necessari fattori genetici addizionali.⁸⁸

Ovviamente, non tutti i geni che sono espressi in maniera aberrante nella leucemia, fanno parte di quel gruppo di geni che viene iporegolato in seguito alla soppressione di HOXA9. Questo implica naturalmente che la trasformazione leucemica mediata dalla proteina di fusione MLL è anche mediata dall'alterazione di altri *pathway*, indipendenti da HOXA9.⁷⁶

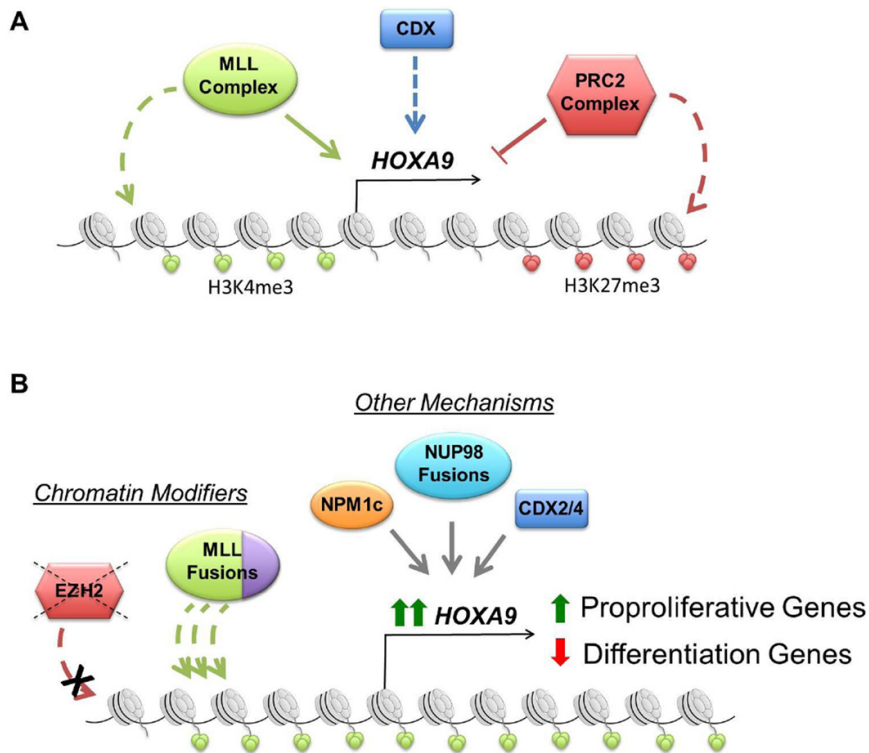


Fig.(11) Regolazione di HOXA9 nell'emopoiesi normale e nella leucemia. A) Durante lo sviluppo e l'emopoiesi, l'espressione di HOXA9 è principalmente regolata dall'azione antagonista di due metiltrasferasi, il complesso MLL e il complesso repressivo polycomb. La prima è responsabile della metilazione di H3K4 (H3K4_{me3}) e quindi di attivazione di HOXA9, mentre la seconda di inibizione della sua espressione mediante metilazione di H3K27 (H3K27_{me3}). B) Un ampio spettro di alterazioni genetiche a monte, portano all'iperregolazione di HOXA9, evento essenziale per lo sviluppo della LAM. Tra queste, la proteina di fusione MLL porta all'attivazione dell'espressione di HOXA9 attraverso fenomeni di disregolazione delle modifiche della cromatina. Altri fattori che portano ad una iperregolazione di HOXA9 sono per esempio mutazioni di NPM1, la formazione della proteina di fusione NUP98 e l'iperespressione di CDX2 e CDX4. HOXA9 promuove la trasformazione neoplastica attraverso l'attivazione di geni implicati nella proliferazione e la repressione di geni indispensabili per il differenziamento.⁸⁸

Sulla base di queste evidenze, la disregolazione della via di segnalazione dei geni HOX sembra essere un meccanismo dominante della trasformazione leucemica. A questa patogenesi

contribuisce il gene di fusione MLL, essendo il diretto responsabile di questa alterata espressione. Nei processi di iniziazione della LAM esiste quindi un modello gerarchico, al cui interno⁸⁷ perché si abbia leucemogenesi, l'alterazione di un singolo gene HOXA non è sufficiente, ma è indispensabile l'alterazione del pattern di espressione di più geni HOXA e dei loro cofattori⁸¹ e il mantenimento dello stato leucemico è sempre dipendente dalla continua presenza dell'oncogene di fusione MLL.⁹⁵ Non solo, in questi processi leucemogenici partecipano anche diversi enzimi coinvolti nel rimodellamento della cromatina e risultano essere indispensabili per la patogenesi della LAM con traslocazione MLL.⁶⁹

I REGOLATORI EPIGENETICI

I. LA FAMIGLIA DELLE ISTONE DEMETILASI (KDM)

Recentemente diversi studi hanno identificato una famiglia di istone demetilasi che presenta un dominio Jumonji (JmjC). Questo dominio contiene una lisina demetilasi (KDMs) che, collaborando in associazione con le istone metil-trasferasi (KMT), catalizza la demetilazione della lisina attraverso una reazione di ossidazione, che può rimuovere tutti e tre gli stati di metilazione sull'istone.^{66 67}

Inizialmente, sono state identificate 5 famiglie di JmjC (KDM2-KDM6), ciascuna con una specificità di metilazione distinta, che va dall'istone H3K36_{me2/me1}, H3K9_{me2/me1} e H3K9_{me3/me2} a H3K4_{me3/me2} e H3K27_{me3/me2}. Tsukada et al. ha più recentemente descritto l'esistenza di un nuovo membro, KDM7, specifico per H3K9_{me2/me1} e H3K27_{me2/me1}.⁹⁶ Pei-Ching Chang *et al.* ha aggiunto un ulteriore nuovo elemento al gruppo, KDM8, che demetila H3K36_{me2}.⁶⁷ Nel complesso, sono quindi riconosciute attualmente 8 famiglie di istone demetilasi, per un totale di 18 membri, con differenti target di metilazione. Questi enzimi lavorano assieme per modificare il codice degli istoni, richiamando diversi set di fattori di trascrizione per regolare il programma di trascrizione cellulare.⁶⁷

II. KDM4 E LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

La famiglia degli enzimi KDM4 (chiamati anche JMJD2) è composta da 4 membri: KDM4A, KDM4B, KDM4C e KDM4D⁶⁹ che rivestono un ruolo importante nel controllo della trascrizione, dell'architettura della cromatina e nel differenziamento cellulare.⁹⁷ 2A, 2B e 2C sono omologhi ed espressi nella maggior parte dei tipi cellulari.

Gli enzimi KDM4 sono delle istone de-metilasi specifiche per H3K9_{me3/me2},⁶⁹ e sono caratterizzate dalla presenza di due domini a dita di zinco *protein/plant homeodomain* associati alla leucemia (LAP/PHD), un dominio JmjN e un dominio JmjC (che contiene una sequenza di legame per la proteina del retinoblastoma, e due domini *Tudor*.⁹⁸

Gli enzimi KDM4 sono iperespressi in molti tumori umani e alcuni studi hanno dimostrato che possono contribuire alla proliferazione delle cellule tumorali. La deplezione dell'attività di KDM4 attraverso la simultanea inattivazione genetica sia di 4A che 4B e 4C è dannosa per la sopravvivenza delle cellule leucemiche, nei modelli murini di LAM con traslocazione MLL-AF9. Al contrario, la deplezione di KDM4C da sola non ha alcun effetto. Questi enzimi sembrano quindi avere un ruolo ridondante nella LAM.⁶⁹

III. KDM4A E KDM4C

KDM4A è stata la prima KDM riconosciuta con specificità per la trimetilazione. Contiene un dominio JmjC e un dominio JmjN vicino al suo N-terminale e un dominio PHD e un *Tudor domain* vicino al suo C-terminale. E' necessario che il dominio JmjC sia intatto perché l'attività di demetilazione di KDM4A sia esplicata. Una mutazione in un singolo aminoacido del sito di legame di Fe(II) è sufficiente ad abolire completamente l'attività catalitica di questo enzima. Il dominio *Tudor* al C-terminale consente di targettare la cromatina e lega preferenzialmente la forma metilata dell'istone H3K4 e H4K20. Attraverso il dominio catalitico JmjC, KDM4A lega anche la forma metilata di H3K9 e H3K36. Nonostante questo enzima mostri una specificità sia per le forme tri e di metilate di entrambi questi due istoni, il suo bersaglio principale rimane H3K9_{me3}, un marcatore di repressione genica.⁶⁷ KDM4A è ampiamente espresso nei tessuti umani e in molte linee cellulari, così come i suoi livelli endogeni di mRNA risultano essere elevati in diversi tipi cellulari.⁹⁸ Questa istone demetilasi può sia stimolare, che inibire l'espressione genica. Generalmente, è visto come un co-attivatore, per esempio attiva i recettori per gli androgeni e gli estrogeni (ER) legandosi ad essi, ma può fungere anche da repressore, quando complessa con la proteina del retinoblastoma (pRb), con la classe I delle proteine istone deacetilasi o con il complesso N-CoR (*nuclear receptor corepressor 1*).^{99 100} Studi precedenti hanno identificato due distinti, ma non mutualmente esclusivi, meccanismi per la repressione della trascrizione indotta dalla proteina del retinoblastoma. Il primo meccanismo coinvolge la diretta interazione di pRb con il dominio di trans-attivazione E2F, che porta al sequestro di E2F e al blocco della sua capacità di stimolare la trascrizione. Il secondo meccanismo si basa sulla possibilità da parte di pRb di richiamare proteine che rimodellano la cromatina, come HDAC, e assemblare complessi di repressione della trascrizione a livello dei promotori regolati da E2F. Diversi esperimenti hanno dimostrato che KDM4A partecipa come componente a questo complesso costituito da pRb e HDAC, promuovendo la deacetilazione degli istoni e la repressione dell'espressione genica.⁹⁸

La disregolazione, e in particolare l'iperespressione, di KDM4A è segnalata in molti tumori¹⁰¹⁹⁷: cancro della prostata, cancro del polmone a piccole cellule, carcinoma del colon e glioma.¹⁰²

La proteina KDM4A è iperespressa nel 60% dei tumori al seno, così come l'mRNA. La sua

iporegolazione nel carcinoma multiplo del colon riduce la proliferazione neoplastica e stimola apoptosi. Nelle cellule di osteosarcoma, la mancanza di KDM4A porta ad un arresto nella fase G₀/G₁ del ciclo cellulare.¹⁰⁰ KDM4A è iperespressa anche nel linfoma, nel medulloblastoma, nel carcinoma gastrico esofageo e nel carcinoma renale. Nella maggior parte di questi casi una sua inibizione nelle cellule neoplastiche sembra dare effetti antitumorali positivi, riducendo la proliferazione delle cellule trasformate.^{103 104 97} KDM4A è anche richiesta per la trasformazione delle cellule leucemiche, nella LAM con traslocazione MLL-AF9, in quanto stimola l'espressione del recettore α dell'interleuchina 3 (IL-3), un attivatore chiave della via di segnalazione JAK-STAT.⁶⁹

KDM4C è strutturalmente simile a KDM4A, possiede una attività enzimatica comparabile e la stessa specificità nei bersagli. Così come KDM4A, anche KDM4C è spesso iperespresso in molti tipi di tumore. Promuove la crescita androgeno-dipendente del carcinoma della prostata, formando complessi e stimolando i recettori per gli androgeni. Lega il fattore Oct-4 coinvolto nei meccanismi di autorinnovamento delle cellule staminali embrionali (ESC) e una sua iporegolazione induce differenziamento nelle ESC, suggerendo che invece la sua iperespressione possa essere particolarmente importante nelle cellule staminali tumorali. Come KDM4A, anche i livelli di mRNA di KDM4C sono alti nel carcinoma del seno. E' iperespresso nel medulloblastoma, nel linfoma associato alla mucosa⁹⁹ e la sua espressione è alterata nel linfoma a cellule B, nel linfoma di Hodgkin, nel carcinoma esofageo e nel carcinoma polmonare metastatico.¹⁰⁵ KDM4C è anche richiamata nella leucemia con traslocazione MLL, dove catalizza la specifica rimozione della metilazione nell'istone H3K9 ed è richiesta per mantenere i geni target in una conformazione della cromatina aperta, per permettere l'espressione genica. Pertanto, i livelli di H3K9_{met3} sono inversamente correlati con lo stato di espressione di HOXA9. Nelle cellule trasformate con traslocazione MLL-AF9, KDM4C è richiamata al promotore di HOXA9, con conseguente perdita di metilazione (e di repressione della trascrizione) dell'istone H3K9_{met3} e acquisizione di uno stato acetilato. L'inibizione di KDM4C porta a differenziamento, arresto del ciclo cellulare e apoptosi, oltre che a iporegolazione di HOXA9 in seguito ad aumento dei livelli di metilazione di H3K9.⁶⁶

IV. DOT1L - SIRT1 - SUV39H1 / H2 E IL LORO RUOLO NELLA LAM

In seguito all'interazione con diversi partner di fusione della proteina MLL (AF10, AF4, AF9 etc), alti livelli del complesso proteico nucleare DOT1L (*Disruptor of Telomeric Silencing-like*), una istone H3K79 metiltrasferasi, possono essere richiamati presso i geni bersaglio della proteina di fusione MLL e portare a espressione genica disregolata.¹⁰⁶

DOT1L è l'unica proteina conosciuta nei mammiferi capace di catalizzare la metilazione della lisina 79 sull'istone 3 (H3K79), che è spesso associata ad attiva trascrizione. Diversi studi

hanno infatti dimostrato che i geni bersaglio della proteina di fusione MLL sono spesso associati a livelli alterati di demetilazione dell'istone H3K79, in particolare nei loci di MEIS1 e HOXA con conseguente *up*-regolazione dell'espressione genica.⁶³

DOT1L e H3K79_{met} sono essenziali per l'iniziazione e il mantenimento della leucemia caratterizzata dalla proteina di fusione MLL,⁹³ e sono richiesti per il mantenimento a lungo termine dell'espressione di HOXA9.¹⁰⁷ La perdita di DOT1L riduce significativamente la leucemogenicità dei blasti leucemici con riarrangiamento MLL,⁶³ mentre molti altri tipi di cellule trasformate non hanno mostrato alcuna sensibilità alla perdita totale di DOT1L e H3K79_{met}.¹⁰⁶ DOT1L contribuisce al mantenimento dell'espressione dei geni bersaglio della proteina di fusione MLL antagonizzando il silenziamento genico indotto dall'istone deacetilasi SIRT1 (Sirtuin 1). L'inibizione di DOT1L nelle leucemie con traslocazione MLL porta a una diminuzione dello stato acetilato dell'istone H3K9 da parte di SIRT1 e alla sua metilazione da parte di SUV39H1 e H2 (*Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1 e 2*), con conseguente perdita di accesso alla cromatina a livello dei geni target della proteina di fusione MLL. Uno studio recente ha scoperto che il complesso di allungamento di cui fa parte AF9, e che interagisce anche con DOT1L, lega direttamente la forma acetilata dell'istone H3K9, con alta affinità, dimostrando una correlazione diretta tra H3K9_{ac} e H3K79_{met2} e una trascrizione genica attiva. Altri studi hanno dimostrato che la proteina di fusione MLL, impedisce la deacetilazione da parte di SIRT1 su H3K9, richiamando in modo costitutivo l'attività di DOT1L, andando quindi a stabilizzare uno stato costante di dimetilazione per H3K79 e di acetilazione per H3K9.¹⁰⁶

SUV39H1 e SUV39H2 fanno parte della famiglia delle proteine SUV39¹⁰⁸: sono enzimi istone metiltrasferasi (HMTasi) coinvolti in diversi processi cellulari, come la regolazione della lunghezza dei telomeri, l'organizzazione dell'eterocromatina e la stabilità genomica.¹⁰⁹ La famiglia delle proteine SUV39H, possiede due domini funzionali distinti: il dominio CD (*chromodomain*) localizzato all'N-terminale e un dominio SET, situato al C-terminale. Il primo dominio ha come bersaglio H3K9_{me3}, il dominio SET è responsabile dell'attività enzimatica di SUV39.¹¹⁰ SUV39H1 è una proteina associata al fattore di trascrizione AML1 (conosciuto anche come RUNX1) che ha un ruolo importante nella regolazione della proliferazione e dell'auto-rinnovamento delle HSC. L'interazione tra AML1 e SUV39H1 e G9a (una lisina metiltrasferasi che fa parte del complesso G9a/GLP) è richiesta per la repressione della trascrizione.¹¹¹ SUV39H1/H2 esprimono per una istone H3K9 metiltrasferasi, indispensabile per la metilazione di H3K9 e quindi per il silenziamento dei geni leucemici implicati nella leucemia MLL-AF9. SIRT1 è richiesto per la loro localizzazione; SIRT1 richiama direttamente SUV39H1 e ne attiva l'attività di metiltrasferasi andando a deacetilare il suo dominio SET. SIRT1 è stata identificata come importante antagonista di DOT1L nelle leucemie con

traslocazione MLL.¹⁰⁶ Le proteine Sir-2, *silent information regulator-2*, o sirtuine sono una famiglia di proteine altamente conservata di nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD) – dipendenti (classe III delle istone deacetilasi). Le sirtuine sono riconosciute come regolatrici critiche della resistenza allo stress, del metabolismo energetico e della tumorigenesi. Esistono 7 sirtuine (SIRT1-7) che mostrano un diverso pattern di espressione, attività catalitica e funzioni biologiche. SIRT1 è la sirtuina maggiormente studiata.^{112 113} SIRT1 regola diverse funzioni cellulari, inclusa la riparazione del DNA, la sopravvivenza cellulare e il metabolismo, attraverso la deacetilazione di proteine bersaglio come gli istoni (H1, H3 e H4) e p53.¹¹⁴ L'attività deacetilasica di SIRT1 contribuisce al silenziamento genico e alla formazione dell'eterocromatina tramite la deacetilazione dell'istone H4K16 e H1K26. SIRT1 controlla anche la trimetilazione di H3K4 da parte di MLL, attraverso una deacetilazione circadiana (residuo K1130 e K1133) di questa proteina, che va a modularne l'attività metiltrasferasica. L'inattivazione di SIRT1 dipende a sua volta dai livelli circadiani di NAD⁺. In aggiunta al suo ruolo nei meccanismi di silenziamento genico e organizzazione della eterocromatina, SIRT1 deacetila anche diverse proteine non istoniche che regolano una grande varietà di processi biologici (crescita cellulare, apoptosi, adattamento a una riduzione dell'apporto calorico, metabolismo e senescenza cellulare). La deacetilazione da parte di SIRT1 può modulare sia proteine oncogeniche che oncosoppressori, pertanto questo enzima può funzionare a sua volta sia da oncogene che da oncosoppressore.

Studi precedenti hanno mostrato un ruolo potenziale di SIRT1 nell'emopoiesi embrionale, nell'emopoiesi dell'adulto in condizioni di ipossia¹¹² e nel regolare l'emopoiesi leucemica mediante p53.¹¹⁵ SIRT1 è infatti ampiamente espressa nelle cellule ematopoietiche sia umane che murine, di tutte le linee, stadi e livello di maturazione. SIRT1 sopprime il differenziamento delle HSC e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi del loro pool in condizioni di stress. Regola il destino delle cellule staminali e coordina la risposta cellulare a stimoli metabolici. SIRT1 è fisicamente associato e regola negativamente HOXA9, regolatore chiave delle HSC. La perdita di SIRT1, associata ad accumulo di danni al DNA e alterazioni genomiche, ha anche un ruolo nell'evoluzione della leucemia e nella resistenza ai trattamenti, andando a promuovere instabilità genica.¹¹² SIRT1 è implicato in diverse malattie, incluso il cancro ed considerato un promettente bersaglio terapeutico.¹¹⁴ All'interno del contesto patologico, SIRT1 può avere un'attività bivalente, sia da oncosoppressore che da oncogene, dipende dal contesto, dal tipo di tessuto in cui è espresso e dai suoi bersagli all'interno di una specifica via di segnalazione normale o tumorale.¹¹⁶ L'iperespressione di SIRT1 può stimolare la crescita tumorale e promuovere la sopravvivenza cellulare in risposta a stress e resistenza farmacologica. Infatti SIRT1 è up-regolato in diversi tipi di tumore, tra cui linfoma, leucemia, cancro della prostata, sarcoma, carcinoma del colon e del polmone.¹¹⁷ SIRT1 è anche considerato un promotore

tumorale nel glioblastoma, data la sua capacità di inattivare proteine che sono coinvolte nei meccanismi di soppressione tumorale e nella riparazione del DNA danneggiato. Studi hanno dimostrato anche che l'iperespressione di SIRT1 è coinvolta nel mantenimento delle LSC nella LCM e anche nella LAM con mutazione FLT3-ITD.¹¹² I livelli di SIRT1 sono significativamente alti nel carcinoma endometriale e sono associati a ridotta sopravvivenza.¹¹⁸ Al contrario, sia il carcinoma mammario che il carcinoma epatico mostrano ridotti livelli di SIRT1 rispetto ai tessuti normali.¹¹⁶ SIRT1 svolge un ruolo di oncosoppressore nel Sarcoma di Edwing, dove una sua attivazione stimola l'efficacia del trattamento antitumorale. SIRT1 regola anche la risposta apoptotica nel carcinoma polmonare a piccole cellule.¹¹⁹ SRT1720 è una piccola e potente molecola attivatore selettiva per SIRT1. Questo attivatore, mediante meccanismo allosterico, stimola e aumenta l'attività enzimatica di SIRT1. SRT1720 diminuisce la vitalità delle cellule di Mieloma Multiplo, senza intaccare la vitalità delle cellule sane,¹²⁰ inducendo apoptosi. Allo stesso tempo però può promuovere la migrazione delle cellule tumorali e metastasi nel polmone.¹¹²

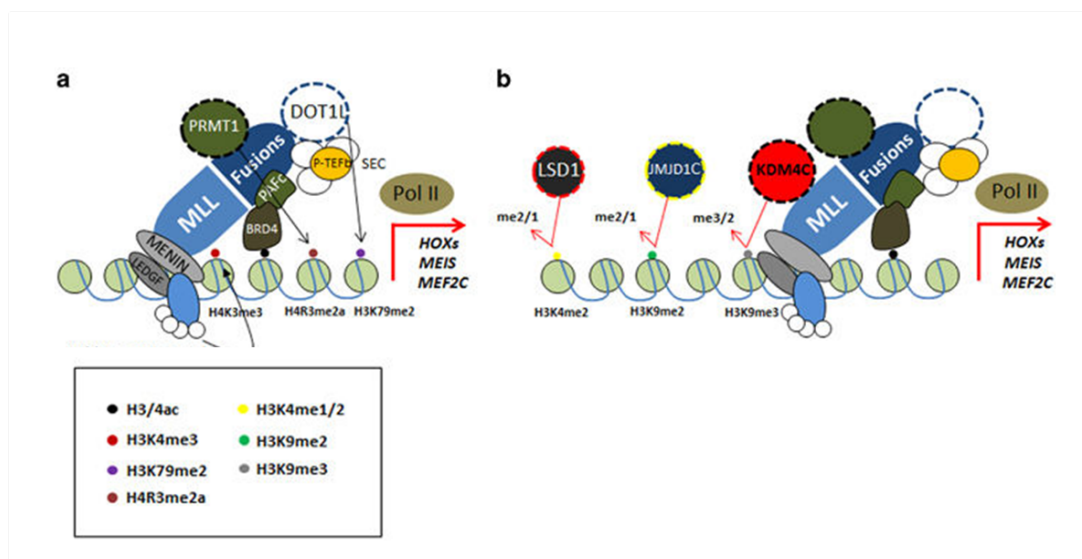


Fig.(12) Ruolo delle istone metiltrasferasi e di KDMs nella trascrizione genica indotta dalla proteina di fusione MLL: A) Il complesso di cui fa parte la proteina di fusione MLL è costituito dall'associazione di diversi fattori, tra cui SEC (super elongation complex), PAFc (polymerase-associated factor complex), le menine e LEDGF (Lens epithelium-derived growth factor) che nel loro insieme permettono di raggiungere e di facilitare l'espressione di geni cruciali per la leucemogenesi, come i geni HOXs, MEIS1 e MEF2C. Alcune metiltrasferasi, come per esempio DOTIL, PRMT1 (Protein Arginine Methyltransferase 1) e MLL stessa, esercitano la loro attività enzimatica su questi geni con conseguente metilazione dell'istone H3K79me2/3 o di H3K4me3 e stimolazione dell'espressione genica. B) Allo stesso tempo, le istone demetilasi

*KDMs (per esempio KDM4C) rimuovono i marcatori di repressione genica, come H3K9me3, favorendo a loro volta la trascrizione dei geni HOXs.*¹²¹

NUOVI POTENZIALI TARGET TERAPEUTICI

E' ormai stabilito che alterazioni delle vie epigenetiche sono comuni in molti tipi di tumori, in particolare l'ipermetilazione dei promotori e la deacetilazione degli istoni.¹¹⁷ Diversi studi preclinici hanno mostrato come la combinazione di più terapie epigenetiche mirate (che colpiscono singoli bersagli specifici) permetta di ottenere un effetto sinergico all'interno della cellula tumorale, sia che l'alterazione epigenetica sia la principale causa della malattia, sia che si tratti di una conseguenza indiretta.⁶³ Pertanto, identificare e caratterizzare gli enzimi responsabili delle modificazioni epigenetiche, come le DNA metiltrasferasi, le istone metiltrasferasi o le istone deacetilasi (HDAC) è diventata un'area di grande interesse per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali. Attualmente, diversi farmaci epigenetici sono stati approvati per il trattamento del cancro. Per esempio gli inibitori delle HDAC, SAHA (conosciuti anche come Vorinostat) e Romidepsin (Istodax), sono usati per il trattamento del linfoma a cellule T. Gli inibitori della DNA metiltrasferasi 5'-azacitidine (Vidaza) e decitabine (Dacogen) sono utilizzati come farmaci per le sindromi mielodisplastiche. Le alterazioni epigenetiche contribuiscono anche alla patogenesi delle malattie emopoietiche, inclusa la LAM. La metilazione aberrante dei promotori, inattiva l'espressione di oncosoppressori che porta ad un blocco del differenziamento e alla disregolazione della proliferazione.¹¹¹ La LAM con la traslocazione MLL è una delle forme leucemiche più aggressive. Spesso diventa refrattaria alla chemioterapia e i pazienti hanno un basso tasso di sopravvivenza rispetto a quelli senza traslocazione. Per questo motivo è urgente lo sviluppo di nuove terapie.⁶⁹ La metilazione del DNA è ampiamente diffusa nelle LAM, e strategie terapeutiche che prevedono anche combinazioni di farmaci epigenetici per il trattamento della leucemia sono in fase di sviluppo.¹²² L'inibitore della metilazione del DNA, Decitabine, ha mostrato una efficacia terapeutica nei protocolli clinici contro la LAM e alcuni studi *in vitro* hanno mostrato anche un suo effetto sinergico con gli inibitori delle istone deacetilasi, andando a riesprimere geni altrimenti silenziati nella patogenesi della LAM.¹²³ Tuttavia, la terapia antitumorale basata sulla costante reversione della metilazione anomala sui promotori, richiede ancora uno studio molto approfondito e dettagliato di come il silenziamento genico indotto dai meccanismi di metilazione funzioni nel cancro.¹²⁴ Alterare i componenti del complesso MLL sta diventando una strategia terapeutica sempre più interessante. Piccole molecole inibitrici capaci di alterare l'interazione tra MLL e le metiltrasferasi bersaglio sono state viste essere efficaci nel ridurre la proliferazione dei blasti leucemici e lo sviluppo della LAM in modelli murini.⁶³ Data la loro attività di supporto della crescita e dello sviluppo di disordini metastatici, gli enzimi lisina

demetilasi (KDM1-7), rappresentano una classe emergente di bersagli, per l'inibizione della demetilazione della lisina come un trattamento terapeutico per i tumori.¹⁰³ Sono infatti in corso studi che prevedono l'utilizzo di piccole molecole inibitrici delle proteine KDM4 per lo sviluppo di nuovi farmaci. Per esempio in letteratura è riportato che colpire l'attività di KDM4 nelle LAM con traslocazione MLL-AF9 è una strategia fattibile per lo sviluppo di nuove terapie.⁶⁹ Il fatto che l'espressione dei geni HOXA sia ridotta quando i livelli di metilazione di H3K27 sono ridotti, ha fatto avanzare l'ipotesi di poter utilizzare l'inibizione di DOT1L come trattamento terapeutico nelle leucemie caratterizzate da alti livelli di espressione dei geni HOXA.⁶³ Da letteratura, l'inibizione di DOT1L da parte di EPZ004777 (un potente e selettivo inibitore di DOT1L) porta a un drastico calo della trascrizione di geni chiave associati alla leucemogenesi delle leucemie con traslocazione MLL, come HOXA9 e MEIS1.¹¹⁷ Attualmente sono in uso in diversi *trial* clinici delle piccole molecole inibitrici di DOT1L, che tuttavia, da sole non sono sufficienti. Alcuni pazienti mostrano farmaco resistenza e altri dopo una risposta positiva iniziale vanno incontro ad altre mutazioni e a progressione della malattia.^{63 65} Per cui, l'ideale sarebbe una terapia mirata che prevede però la combinazione di più farmaci, che vadano quindi a colpire più meccanismi coinvolti nella patogenesi della leucemia o che permettano di sensibilizzare le cellule tumorali alla terapia primaria. Inoltre, il fatto che questi inibitori di DOT1L e di altri meccanismi epigenetici spesso portano solo ad arresto del ciclo cellulare e a stimolo del differenziamento, è evidente la necessità di più approcci terapeutici combinati per eradicare completamente le cellule maligne. Per esempio, la lisina deacetilasi SIRT1, sembra rivestire un ruolo importante.¹⁰⁶ Il doppio ruolo di SIRT1 nel modulare lo stato di acetilazione sia di proteine che della cromatina, lo rende un attrattivo bersaglio terapeutico per lo sviluppo di farmaci antitumorali.¹¹⁷ Il trattamento dei blasti leucemici con un attivatore farmacologico di SIRT1, è stato visto essere efficace per aumentare la suscettibilità delle cellule leucemiche al trattamento con inibitori di DOT1L.⁶³ Purtroppo c'è ancora molta strada da percorrere. Ci sono ancora diversi ostacoli che influenzano l'efficacia di queste terapie contro il cancro: per esempio l'eterogeneità cellulare, la resistenza farmacologica, e soprattutto la necessità di dover andare a colpire sempre più in profondità funzioni cellulari complesse e articolate.⁶³

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della mia ricerca è stato quello di studiare la relazione tra la via di segnalazione dei messaggeri inositidici e la leucemia, focalizzandomi sul ruolo della fosfolipasi C beta 1 (PLC β 1) nella Leucemia Mieloide Acuta, con l'obiettivo di identificare nuovi potenziali *target* terapeutici.

Il principale problema legato alla LAM, e che ancora non ha trovato soluzione, è il fatto che le attuali terapie convenzionali, non riescono ad eradicare completamente i blasti leucemici. Una buona percentuale di malati non è responsivo ai trattamenti e presenta un basso grado di remissione o va incontro a ricaduta. A queste criticità si aggiungono altri due motivi di insuccesso terapeutico: l'insorgenza di farmaco resistenza e gli effetti collaterali, come tossicità fatale, dati dalla somministrazione di alte dosi di farmaci chemioterapici. Inoltre, i meccanismi proapoptotici di quest'ultimi non sono limitati alle sole cellule neoplastiche, ma si estendono a tutte le cellule attivamente proliferanti, comprese le cellule emopoietiche normali. Da qui, la necessità di sviluppare nuovi, più efficaci e soprattutto bersaglio specifici trattamenti terapeutici per la LAM.^{7 9 10}

La letteratura ha ormai stabilito l'esistenza nel nucleo di un *pool* di fosfoinositidi (PI) e di enzimi che li regolano, che partecipano a vie di segnalazione indipendenti rispetto alla controparte citoplasmatica^{17 125} Fra questi enzimi nucleari, la fosfolipasi C (PLC) beta 1 ricopre un ruolo importante nel controllare un'ampia varietà di funzioni cellulari, e diversi studi hanno dimostrato l'implicazione di questo enzima nelle sindromi mieloidisplastiche e nella loro progressione leucemica.¹²⁶ Recentemente, numerosi studi hanno dimostrato il potenziale ruolo dei PI nucleari e dei loro enzimi regolatori nel controllo diretto delle proteine responsabili delle modificazioni della cromatina. Questo fa sperare in un loro futuro utilizzo come nuovi potenziali bersagli farmacologici, per lo sviluppo di nuove terapie combinate, anche per la LAM.^{19 126}

Da precedenti risultati (dati non ancora pubblicati), ottenuti all'interno del gruppo di ricerca in cui mi sono inserita, è emerso che la PLC β 1 è essenziale per la crescita cellulare, quando paragonata a tutte le altre isoforme di PLC. E' stato visto che, silenziando attraverso una libreria di *short hairpin RNA* (*shRNA*), le diverse isoforme di PLC conosciute, solo il silenziamento della PLC β 1 è capace di ridurre significativamente la crescita neoplastica dei blasti leucemici nella LAM. In particolare, differenti linee cellulari di leucemia e di LAM hanno mostrato una importante sensibilità alla mancata espressione della PLC β 1. Il silenziamento della PLC β 1 riduce la crescita delle THP-1 (linea cellulare di AML) *in vivo* in modelli *xenograft* e

diminuisce la crescita delle cellule staminali leucemiche murine che esprimono la proteina di fusione MLL-AF9, senza invece avere effetto sulla proliferazione o il differenziamento dei progenitori emopoietici o delle cellule staminali murine sane. Infine, il silenziamento della PLC β 1 inibisce la crescita dei blasti leucemici umani, lasciando invece intatta la capacità proliferativa e differenziativa della controparte sana.

L'ipotesi su cui si basa il presente studio è che l'inibizione della crescita della LAM indotta dal silenziamento della PLC β 1 avvenga, in parte, dalla sua capacità di modulare il *signaling* epigenetico che è responsabile dell'espressione di geni indispensabili per il mantenimento della proliferazione leucemica. Nello specifico si ipotizza che la PLC β 1 interagisca e regoli l'attività di due demetilasi dell'istone H3K9 (H3K9_{me3}), ossia KDM4A e KDM4C.

Pertanto, l'obiettivo generale è quello di scoprire come la PLC β 1 nucleare possa influenzare i meccanismi epigenetici e come questo abbia un effetto sulla trascrizione genica e la crescita neoplastica nella LAM. Il fine è quello di dimostrare una potenziale applicazione di inibitori per la PLC β 1 come terapia contro la LAM *in vivo*, sia da soli, che anche in combinazione con altri farmaci chemioterapici.

Per studiare il ruolo della PLC β 1 nella LAM, l'espressione di questo enzima è stata silenziata stabilmente mediante trasduzione lentivirale utilizzando una libreria di *short hairpin* RNA, in una linea cellulare monocitica di LAM, con traslocazione MLL-AF9, ossia le THP-1. Gli effetti di questo silenziamento sono stati valutati sia sulla crescita cellulare (analisi del ciclo cellulare, saggi apoptotici e saggi clonogenici) sia analizzando l'espressione di proteine e di geni coinvolti nei meccanismi leucemici di proliferazione dei blasti. Dato il ruolo della PLC β 1 nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche, è stata quindi indagata la possibile relazione tra questo enzima e differenti fattori epigenetici implicati nella patogenesi della LAM. Il meccanismo epigenetico che è stato più approfonditamente studiato riguarda l'interazione tra la PLC β 1 e due istone demetilasi appartenenti alla famiglia delle KDM4 (KDM4A e KDM4C).

Lo scopo è stato quello di capire come il silenziamento della PLC β 1 sia responsabile di una diminuzione della crescita neoplastica e quali siano gli intermediari del *signaling* della PLC β 1 responsabili delle modificazioni dell'assetto epigenetico e trascrizionale nelle cellule leucemiche. Al fine di poter applicare inibitori per la PLC β 1 nel trattamento contro la LAM anche insieme ad altri inibitori (o attivatori) di nuovi potenziali target terapeutici.

MATERIALI E METODI

1. LINEE CELLULARI

Il presente studio è stato condotto utilizzando una linea cellulare di Leucemia Mieloide Acuta, la linea THP-1, e la linea cellulare HEK293FT (*Human Embryonic Kidney*).

La linea **THP-1** appartiene al sottotipo M5, secondo la classificazione FAB. Si tratta di cellule immortalizzate isolate dal sangue periferico di un paziente di 1 anno affetto da Leucemia Mieloide Acuta monocitica (monoblastica). Le THP-1 sono caratterizzate dalla presenza di una traslocazione della regione p22 del cromosoma 9 sulla regione q23 del cromosoma 11, con conseguente formazione della proteina di fusione aberrante MLL-AF9.

Le THP-1 possiedono una morfologia tondeggiante e crescono in sospensione, in terreno RPMI 1640 a cui è stato aggiunto 10% FBS, 5% Penicillina/Streptomicina, 5% L-Glutammina (*Sigma Aldrich*). I tempi di duplicazione sono intorno agli 1-2 giorni e la concentrazione di crescita ottimale è di 300.000 cellule/ml.

La linea **HEK293FT** deriva dalla trasformazione di cellule renali embrionali con frammenti di DNA dell'Adenovirus5. Il vantaggio che si ricava dall'utilizzo di questa linea cellulare, è la facilità con cui può essere trasfettata. Le HEK293FT crescono in adesione in terreno DMEM a basso glucosio 1000 mg/L a cui è stato aggiunto 10% FBS, 5% Penicillina/Streptomicina, 5% L-Glutammina (*Sigma Aldrich*).

Entrambe le linee cellulari crescono in incubatore alla temperatura di 37°C, 5% di CO₂.

2. SILENZIAMENTO DELLE THP-1

2.1. GENERAZIONE DEL VETTORE LENTIVIRALE

Il silenziamento nelle THP-1 della PLCβ1 e delle altre proteine studiate, è stato ottenuto mediante RNA *interference*, utilizzando una libreria di *short hairpin* RNA (*shRNA*). Si tratta di piccoli oligonucleotidi di 20-25 bp, che riconoscono e legano una porzione complementare dell'RNA messaggero della proteina target, formando un doppio filamento. Questa struttura viene riconosciuta dalla cellula come un danno cellulare o infezione virale e pertanto il doppio filamento, e quindi l'mRNA per la PLCβ1, si degrada. Come conseguenza la proteina della PLCβ1 non viene più prodotta. L'impiego di più oligonucleotidi con piccole differenze nella loro sequenza, ma tutti complementari verso lo stesso messaggero, permette di ovviare a eventuali effetti *off-target* ed essere quindi certi che gli effetti osservati in seguito al silenziamento siano conseguenza dalla mancanza della proteina stessa e non della mancanza di proteine aspecifiche (con sequenze parzialmente omologhe a quelle contenute negli *shRNA*). L'*shRNA* è contenuto all'interno di un plasmide lentivirale pLKO.1 puro (*Mission Sigma*) ed è

introdotto all'interno delle THP-1 mediante trasfezione con un lentivirus. I lentivirus appartengono alla famiglia *Retroviridae*, hanno un genoma costituito da due molecole di RNA a singolo filamento a polarità positiva e sono provvisti di *envelope*. Essi consentono una trasfezione duratura e stabile nel tempo, in quanto vanno ad integrarsi nel DNA della cellula ricevente. In questo modo il silenziamento viene trasmesso anche alle cellule figlie. Il lentivirus è prodotto all'interno delle cellule ospiti HEK293FT, che sono trasfettate con il DNA plasmidico e le componenti necessarie per l'assemblaggio del virus nella cellula ospite:

- Vettore pLKO.1 puro con inserito la sequenza per l'*shRNA* e contenente la sequenza Ψ (sequenza di assemblaggio, indispensabile per l'incapsulamento del genoma virale all'interno della particella lentivirale)
- Vettore pCMV-gag-pol che contiene il gene *gag*, che esprime per la proteina strutturale del capsid, e *pol* che codifica per la polimerasi virale (trascrittasi inversa). Entrambi sono sotto il controllo del promotore CMV - citomegalovirus
- Vettore pVSV-g che esprime per la glicoproteina VSV-g dell'*envelope*, responsabile del tropismo virale.

Per silenziare la PLC β 1 nelle THP-1 sono stati utilizzati due oligonucleotidi, oligo2 (#2) e oligo3 (#3). Per silenziare gli enzimi KDM4A o KDM4C sono stati utilizzati due oligonucleotidi per ciascun enzima, oligo1 (#1) e oligo5 (#5). Per SUV39H1, SUV39H2 o i geni PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1, RGS16 e DHRS9 sono stati usati due oligonucleotidi, oligo1 (#1) e oligo2 (#2), specifici per ciascuna proteina studiata. La sequenza di ciascun oligonucleotide è contenuta all'interno di un vettore pLKO.1 puro (*Mission Sigma*). Come controllo, è stato utilizzato un vettore pLKO.1 puro (*Mission Sigma*), contenente una sequenza oligonucleotidica che non si appaia a nessuna sequenza conosciuta all'interno delle cellule (SHX).

Le HEK293FT sono state seminate 10⁶ cellule / pozzetto all'interno di una piastra da sei pozzetti, in un volume finale di 2ml di DMEM ed incubate a 37°C 5% CO₂ per 4 ore. Allo scadere dell'incubazione le cellule sono state trasfettate con una mix di trasfezione per produrre il lentivirus.

La mix è composta da:

- ✓ 1,14 μ g di DNA plasmidico pLKO.1 contenente *shRNA*;
- ✓ 0,57 μ g di vettore pCMV-gag-pol;
- ✓ 0,28 μ g di vettore pVSV-g;
- ✓ 6 μ g di polyethylenimine (PEI), un agente trasfettante;
- ✓ Opti-MEM per portare a volume finale (V_f) di 100 μ l;

La mix di trasfezione è stata incubata 20 minuti a temperatura ambiente e distribuita goccia a goccia nel pozzetto. Le cellule sono state incubate *overnight* in incubatore a 37°C 5%CO₂.

Il giorno successivo il terreno è stato cambiato e sostituito con 2 ml di DMEM fresco. Le cellule sono state incubate 24 ore in incubatore a 37°C, 5% CO₂.

A 48h dalle trasfezione le HEK293FT rilasciano il lentivirus prodotto nel terreno di coltura. Per tanto il DMEM contenente il lentivirus, è stato recuperato tramite siringa e filtrato con filtro da 0,45µM. In questo modo, tutti i detriti cellulari e le HEK293FT che possono trovarsi in sospensione rimangono intrappolate nel filtro, mentre la dimensione dei pori consente al lentivirus di attraversarli ed essere recuperato. Il lentivirus può già essere utilizzato per la trasfezione delle THP-1 oppure conservato a -80°C. Alle cellule è stato quindi aggiunto nuovo terreno (2 ml DMEM) e sono state incubate a 37°C, 5% CO₂ per altre 24 ore. Il giorno dopo, sono state raccolte nuove aliquote di lentivirus, secondo il procedimento appena descritto.

2.2. TRASFEZIONE DELLE THP-1 (SPINOCULAZIONE)

Il silenziamento delle THP-1 è stato ottenuto tramite trasfezione delle cellule con il lentivirus prodotto nelle HEK293FT. La trasfezione è stata condotta mediante una tecnica chiamata spinoculazione, che prevede la centrifugazione delle THP-1, con il lentivirus, ad alta velocità.

Le THP-1 sono state seminate 10⁶ cellule / pozzetto all'interno di una piastra da sei pozzetti, in un volume finale di 100 µl di RPMI, a cui è stato aggiunto l'agente trasfettante polybrene (5 µg). Infine sono stati aggiunti 900 µl di medium contenente il lentivirus per ciascun pozzetto. Le cellule sono state centrifugate a 2.200 rpm per 30'. Terminata la centrifugata, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 2 ml di RPMI per portare le cellule alla giusta concentrazione finale di 300.000 cellule / ml. Le THP-1 sono state incubate a 37°C 5%CO₂, *overnight*.

2.3. SELEZIONE DELLE THP-1 TRASFETTATE

Il plasmide contenente la sequenza per *shRNA* contiene anche una resistenza all'antibiotico puromicina, che permette di selezionare le cellule trasfettate con successo. Pertanto le THP-1 spinoculate sono state incubate, a 24 ore dalla trasfezione, con 1µg/ml di puromicina (*Carlo Erba Reagent*) per 48 ore in incubatore a 37°C, 5% CO₂. Come testato, le THP-1 che non hanno internalizzato il plasmide vanno incontro a morte cellulare dopo due giorni. A questo punto le cellule vive, sono state separate dalle morte mediante gradiente di densità (FICOLL).

3. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA: REAL TIME PCR

Il silenziamento nelle THP-1 della PLCβ1 o degli altri geni studiati è stato valutato mediante la simultanea amplificazione e quantificazione dell'espressione genica della PLCβ1, ossia Real

Time PCR (*quantitative* PCR o *qPCR*). La *qPCR* è stata effettuata su campioni di cDNA ottenuto mediante reazione di retrotrascrizione a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 silenziate.

3.1. ESTRAZIONE DELL'RNA

Le THP-1 sono state lavate 2 volte in PBS 1X a 1500 rpm per 5', portando ogni volta il pellet a secco. L'RNA è stato quindi estratto mediante *kit* NucleoSpin RNA (*Macherey-Nagel*) e la concentrazione finale di RNA ottenuta è stata quantificata con il NanoDrop.

A questo punto l'RNA è stato retrotrascritto a cDNA.

3.2. RETROTRASCRIZIONE DELL'mRNA

La retrotrascrizione è stata condotta utilizzando l'enzima trascrittasi inversa M-MuLV RT (*RevertAid Reverse Transcriptase - RT; Thermo Fisher*). 2 ug di RNA sono stati incubati per 5' a 65°C insieme a 0,5 µg di Oligo(dT)₁₈ (*Thermo Fisher*) portando con H₂O a volume finale di 12,5 µl. Successivamente a ciascun campione sono stati aggiunti 7,5 µl della seguente mix di reazione per un volume finale di 20 µl: Buffer 1X; 1 mM di dNTPs; 20 U di RNasi *inibitor* e 200U di MMLV (*Thermo Fisher*). I campioni sono stati incubati a 42°C per 1 ora e a 70°C per 10'. Il cDNA ottenuto è stato portato alla concentrazione finale di 20 ng/µl.

3.3. REAL TIME PCR

Per la Real Time PCR è stata preparata una mix di reazione contenente la sonda *TaqMan* (*Eagle TaqMan master mix; Roche*) o la sonda *SYBR Green* (*Power up SYBR Green master mix; Applied Biosistem*) e una mix contenente due primer e una sonda per il gene bersaglio: 10 µl *TaqMan Master Mix 2X* / 10 µl *SYBR Green master mix*; 1 µl *Human PrimeTime StdqPCR Assay 20X (IDT)* / 1 µl *Human PrimePCR Assay 20X (Bio-Rad)*; 100 ng di cDNA (5 µl); acqua per portare a volume finale di 20 µl. La mix insieme al cDNA è stata caricata in una piastra da 96 pozzetti, 20 µl per pozzetto e la piastra è stata inserita nel termociclature (*7300 Real Time PCR system; Applied Biosistem*) con le seguenti impostazioni: 2' a 50°C, 10' a 95°C, 40 cicli a 95°C per 15'' e 1' a 60°C.

Per PLCβ1, HOXA9, HOXA7, MEF2C, PUO6F, SNAI1, ELK1, KDM4A, KDM4C, SUV39H1 e SUV39H2 sono stati usati i primer specifici *Human PrimeTime StdqPCR Assay (IDT)* e la sonda *TaqMan* (*Eagle TaqMan master mix; Roche*). Per PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1, RGS16 e DHRS9 sono stati usati i primer specifici *Human PrimePCR Assay 20X (Bio-Rad)* e la sonda *SYBR Green* (*Power up SYBR Green master mix; Applied Biosistem*).

La quantificazione è stata calcolata paragonando tra loro i Ct per determinare la differenza d'espressione di un gene bersaglio in un campione, rispetto ad un altro campione scelto come calibratore. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno *standard*, ossia la GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi umana). La quantificazione relativa rispetto al controllo (*fold change*) è stata stimata con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, in cui il $\Delta\Delta Ct$ corrisponde alla differenza fra il ΔCt del campione silenziato e il ΔCt del controllo SHX. Il ΔCt è la differenza, per ciascun campione, tra il Ct del gene in analisi e il Ct del gene *standard* interno GAPDH.

4. ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA: WESTERN BLOT

L'analisi dell'espressione proteica della PLC β 1, e di tutte le altre proteine studiate è stata condotta mediante la tecnica del Western Blot. Le THP-1 sono state lavate due volte in PBS 1X (*Sigma Aldrich*) e centrifugate per 5' a 1500 rpm. Una volta portato a secco il pellet, quest'ultimo è stato risospeso nel tampone di lisi RIPA contenente gli inibitori per le proteasi e le fosfatasi (*HaltTM Protease and phosphatase inhibitor cocktail; Thermo Scientific*) e incubato 30' in ghiaccio. A questo punto il lisato proteico è stato centrifugato per 10' a 13.000 rpm a +4°C per eliminare i detriti. Il surnatante, contenente il lisato proteico, è stato trasferito in una nuova eppendorf e quantificato. La concentrazione proteica è stata misurata in triplicato allo spettrofotometro (*Beckman DU 640 spectrophotometer*) usando il colorante Bradford (*Protein assay, Dye reagent concentrate; Bio-Rad*). Una volta quantificato, il campione di lisato proteico è stato preparato per essere caricato su gel di elettroforesi. Alle proteine sono stati aggiunti il *loading buffer 4X Laemmli sample Buffer (Bio-Rad)* insieme al β -mercaptoetanololo (*Sigma*). Le proteine sono state quindi bollite per 5' a 95°C e caricate nel gel di poliacrilammide. Oltre ai campioni, nel gel sono stati caricati anche 5 μ l di *marker (Precision Plus ProteinTM Standards; Bio-Rad)*. Il gel di poliacrilammide è composto da due fasi: la prima, *stacking gel* è composta da una mix di acrilammide 30% (*Sigma*); Tris 1.5 M pH 6.8 (*Bio-Rad*); 10% sodio dodecilsolfato (SDS); 10% ammonio persolfato (APS) e tetrametiletildiammina (Temed) (*Sigma*). La seconda, *running gel* è composta da una mix di acrilamide 30% (*Sigma*); Tris 1.5 M pH 8.8 (*Bio-Rad*); 10% sodio dodecilsolfato (SDS); 10% ammonio persolfato (APS) e tetrametiletildiammina (Temed) (*Sigma*). All'interno di una camera di corsa contenente il tampone di corsa 1X (tampone di corsa 10X: 10 gr SDS; 144 gr glicina; 30 gr TRIS Base per un volume finale di 1L), il gel è stato fatto correre per 1 ora e 30' ad un voltaggio di 100 volt. Al termine della corsa, il gel, su cui si sono separate le proteine, è stato posto a contatto con una membrana di nitrocellulosa (*Bio-Rad*) per permettere il trasferimento delle proteine su di essa. Il trasferimento è stato effettuato a voltaggio costante (100 volt) all'interno di un tampone di trasferimento 1X (700 ml H₂O + 200 ml di Metanolo + 100 ml tampone di trasferimento 10X)

per 1 ora e 30'. La ricetta del tampone di trasferimento 10X è la seguente: 144 gr glicina ; 30 gr TRIS base per un volume finale di 1L. Avvenuto il trasferimento, la membrana è stata incubata per 1 ora in agitazione e a temperatura ambiente nel *Blocking Buffer* (PBS 1X 0,1% *Tween-20* + 5% *nonfat dry milk*). A questo punto la membrana è stata incubata *overnight* a +4°C, in agitazione, con l'anticorpo primario (Ab I) specifico per ogni proteina: anti-PLC β 1 rabbit (*Santa Cruz*) diluito 1:1000 in PBS 1X 0,1% *tween-20*. Anti-pRb(ser780) rabbit 1:1000; Anti-pRb(ser807/811) rabbit 1:1000; Anti-Rb (4H1) mouse 1:2000; Anti-p21 rabbit 1:1000; Anti-p27 rabbit 1:1000; Anti-proCaspasi8 rabbit 1:1000; Anti-PARP1 rabbit 1:1000 (*Cell Signaling*). Anti-KDM4A rabbit 1:2000 (*Bethyl laboratories*); anti-KDM4C rabbit 1:2000 (*Novusbio*). Gli AbI sono stati diluiti in PBS 1X 0,1% *tween-20* + 5% BSA o + 5% *nonfat dry milk* secondo quanto riportato nel manuale d'uso.

Terminata l'incubazione, sono stati fatti 3 lavaggi da 5' ciascuno in agitazione con PBS 1X 0,1% *tween-20*. A questo punto è stato aggiunto l'anticorpo secondario (AbII) diluito 1:10.000 in PBS 1X 0,1% *tween-20*. La membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente. In seguito ad altri 3 lavaggi da 10' ciascuno sempre in agitazione con PBS 1X 0,1% *tween-20*, la membrana è stata immersa in una soluzione composta da due substrati chemiluminescenti in rapporto 1:1, *Luminol Solution* + *Peroxide Solution* (*Super Signal West Pico Solution*; *Thermo Scientific*). In seguito ad esposizione, questi substrati emettono un segnale tale da permette di rilevare la presenza della banda di interesse sulla membrana. La membrana è stata sviluppata usando la camera digitale Kodak *image station* 2000.

5. SAGGIO CLONOGENICO

Per studiare gli effetti del silenziamento della PLC β 1 o degli altri geni studiati sulla capacità di crescita cellulare della LAM, le THP1 silenziate sono state seminate in un terreno di crescita semisolido *Methocult* (*Stemcell Technologies*) insieme al controllo SHX a 48 ore dalla trasfezione. Il *Methocult* è un terreno di crescita semisolido di metilcellulosa, contenente citochine ed altri fattori di crescita che permette di ricreare, *in vitro*, delle condizioni di crescita simili a quelle del microambiente midollare *in vivo* per i precursori emopoietici. Per ciascun campione, 5000 THP-1 sono state trasferite in 1 ml di *Methocult*, che è stato vortexato per distribuire in modo omogeneo le cellule. Quest'ultimo è stato quindi suddiviso in 3 pozzetti all'interno di una piastra da 24 pozzetti (triplicato), circa 330 μ l/pozzetto. Le cellule sono state incubate a 37°C e al 5% di CO₂. Trascorsi 10-15 giorni dalla semina il numero di colonie è stato contato al microscopio ottico.

6. CRESCITA COMPETITIVA

La valutazione della capacità proliferativa delle cellule leucemiche, quando la PLC β 1 è silenziata, è stata condotta mediante crescita competitiva tra le THP-1 silenziata per la PLC β 1 e delle THP-1 controllo, marcate tutte GFP. 10⁶ di cellule THP-1 silenziata per la PLC β 1 o il controllo SHX sono state seminate insieme ad altrettante THP-1 "verdi" trasfettate con il vettore pLKO.1 GFP ed incubate a 37°C, 5% CO₂. La percentuale di THP-1 "verdi" marcate GFP presenti all'interno di questo *pool* misto di cellule è stata misurata a diversi tempi tramite acquisizione al citofluorimetro (*FC500 flow cytometer; Beckman Coulter Inc.*). Sulla base di quest'ultima è stata calcolata la corrispettiva percentuale di cellule "bianche" presenti all'interno del *pool*, ossia THP-1 silenziata per la PLC β 1 e THP-1 controllo.

7. CICLO CELLULARE

Per studiare gli effetti del silenziamento della PLC β 1 sulla progressione del ciclo cellulare nella LAM, l'analisi del ciclo cellulare delle THP-1 silenziata per la PLC β 1 è stata condotta mediante marcatura con *Propidium Iodide (PI)/RNase* e acquisizione al citofluorimetro. La marcatura è stata effettuata secondo il seguente protocollo: 10⁶ di cellule sono state lavate 2 volte con PBS freddo (+4°C) e centrifugate per 5' a 1500 rpm e permeabilizzate utilizzando 1 ml di 70% etanolo freddo (-20°) aggiunto goccia a goccia vortexando il pellet di cellule. Le cellule sono state incubate dai 10' ai 30' a -20°C. Successivamente l'etanolo è stato rimosso aggiungendo 2 ml di PBS 1X (freddo) e centrifugando per 5' a 1500 rpm, per due volte. Il pellet è stato risospeso in 500 μ l di una soluzione di PBS 1X contenente PI alla concentrazione finale di 40 μ g/ml più RNasi (100 μ g/ml). Le cellule sono state quindi incubate 15' a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione i campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro (*FC500 flow cytometer; Beckman Coulter Inc.*). L'analisi invece è stata condotta mediante il software *FlowJo*.

8. INIBIZIONE DELLA FOSFOLIPASI C CON U73122

Per dimostrare che gli effetti indotti dal silenziamento della PLC β 1 sull'espressione dei geni HOXA9, MEF2C e HOXA7 siano dovuti alla perdita di una funzione di questo enzima, le THP-1 sono state trattate con un inibitore specifico per la Fosfolipasi C, U73122 (*Sigma*), alla concentrazione di 5 μ M. Come controllo è stato usato il suo corrispondente analogo inattivo U73343 (*Sigma*), alla stessa concentrazione. A 48 ore dal trattamento, l'espressione dei geni HOXA citati è stata valutata mediante Real Time PCR usando la sonda *Taqman (Eagle TaqMan master mix; Roche)* e la sequenza dei primer specifici per HOXA9, HOXA7 e MEF2C (*Human PrimeTime StdqPCR Assay; IDT*).

9. SAGGI APOPTOTICI

Lo studio sul potenziale effetto pro-apoptotico del silenziamento della PLC β 1 nella LAM è stato condotto mediante valutazione dell'apoptosi, tramite marcatura di Annexin V (*Annexin V-FITC Apoptosis detection kit; eBioscience DX*) e acquisizione al citofluorimetro.

La marcatura delle cellule è stata effettuata secondo il seguente protocollo: 10⁶ di THP-1 sono state lavate con PBS e centrifugate per 5' a 1500 rpm per due volte e risospese in 500 μ l di *Binding Buffer* 1X. Le cellule sono quindi state incubate con 5 μ l di di Annexin V-FITC per 15' a temperatura ambiente e al buio. Successivamente i campioni sono stati centrifugati per 5' a 1500 rpm e risospesi in 500 μ l di *Binding Buffer* 1X più 3 μ l di PI. I campioni sono stati letti al citofluorimetro (*FC500 flow cytometer; Beckman Coulter Inc.*). L'analisi è stata condotta mediante il software *FlowJo*.

10. RIPRISTINO DEL FENOTIPO LEUCEMICO

10.1 SILENZIAMENTO DI SUV39H1 E SUV39H2 NELLE THP-1

Le THP1 sono state silenziate per la PLC β 1 (#2), mediante trasduzione lentivirale con un vettore pLKO.1 contenente GFP, ma senza la resistenza alla puromicina (*Sigma*). Le cellule PLC β 1 silenziate sono state sortate per la GFP e silenziate nuovamente per ciascun oligo di SUV39H1 (#1 e #2) o per SUV39H2 (#1 e #2) sempre mediante trasduzione lentivirale, questa volta con un vettore pLKO.1 puro (*Sigma*). A questo punto le cellule sono state selezionate per 48 ore con 1 μ g/ml di puromicina e seminate in *Methocult* (*Stemcell Technologies*) insieme al controllo SHX. Trascorsi 12 giorni dalla semina il numero di colonie è stato contato al microscopio ottico.

10.2 SILENZIAMENTO DI DHRS9 NELLE THP-1

Le THP1 sono state silenziate per DHRS9 con due diversi oligo (#1 e #2) mediante trasduzione lentivirale e selezionate per 48 ore con 1 μ g/ml di puromicina. Successivamente sono state nuovamente spinolate per silenziare la PLC β 1 (#2) e dopo 48 ore sono state seminate in *Methocult* (*Stemcell Technologies*) insieme al controllo SHX. Trascorsi 7 giorni dalla semina il numero di colonie è stato contato al microscopio ottico.

11. ATTIVAZIONE DI SIRT1 NELLE THP-1

Le THP-1 sono state silenziate per la PLC β 1 mediante trasduzione lentivirale. 48 ore dopo la trasfezione, sia il controllo SHX che le THP-1 silenziate sono state trattate con dosi crescenti di un attivatore allosterico di SIRT1, SRT1720 (*Santa Cruz*) alla concentrazione di 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M e 10 μ M. Come controllo è stato usato l'agente diluente l'attivatore, ovvero il DMSO

(Sigma). Le cellule sono state immediatamente seminate in *Methocult* (Stemcell Technologies) secondo la metodica precedentemente descritta. Trascorsi 10 giorni dalla semina il numero di colonie è stato contato al microscopio ottico.

12. SAGGI DI CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE (Co-IP)

Entrambe le isoforme della PLC β 1 (PLC β 1a/1b), KDM4A e KDM4C sono stati iperespressi all'interno delle THP-1, mediante trasduzione lentivirale sia singolarmente che in combinazione tra di loro (PLC β 1+KDM4A e PLC β 1 + KDM4C), secondo il seguente schema:

- 2 μ g di vettore vuoto pCDNA 2.1
- 0,5 μ g di PLC β 1a in pCDNA 2.1 + 0,5 μ g PLC β 1b in pCDNA 2.1
- 1 μ g di KDM4A in pCMV taggato HA
- 0,5 μ g di PLC β 1a in pCDNA 2.1 + 0,5 μ g PLC β 1b in pCDNA 2.1 + 1 μ g di KDM4A in pCMV taggato HA
- 1 μ g di KDM4C in pCMV taggato HA
- 0,5 μ g di PLC β 1a in pCDNA 2.1 + 0,5 μ g PLC β 1b in pCDNA 2.1 + 1 μ g di KDM4C in pCMV taggato HA-

A 48 ore dalla trasfezione le THP-1 sono state lisate in 500 μ l di NP40 1% (NP40 1%; glicerolo 10%; MgCl 3mM; KCl 80 mM; Tris HCl 50 mM pH 7.5) e immunoprecipitate con 0,8 μ g di Ab anti-PLC β 1 Rabbit (*Santa Cruz*) insieme a 0,8 μ g di Ab anti-PLC β 1 Mouse (*Santa Cruz*) *overnight* a +4°C in rotazione. 10 μ l di lisato totale, prima dell'aggiunta dell'Ab, sono stati conservati per ciascuna condizione. Il giorno seguente, ai campioni immunoprecipitati sono stati aggiunti 17 μ l della proteina A/G e sono stati incubati 1 ora a +4°C in rotazione. A questo sono seguiti 3 lavaggi con 1 ml di Buffer (TrisHCl 50mM pH 7.5; EDTA 5mM; NaCl 150mM; Tween 0,1%) e centrifugati per 1' a 5000 rpm a freddo. Il pellet immunoprecipitato è stato portato a secco con una siringa da 1ml. Il lisato è stato risospeso in un volume finale di 30 μ l di *Loading Buffer* 4X e tutto il campione è stato corso in un gel di poliacrilammide all'8%, insieme ai 10 μ l di lisato totale non immunoprecipitato, secondo la tecnica di Western Blot precedentemente descritta. La membrana è stata saturata per 1 ora a temperatura ambiente in *Blocking Buffer* (PBS 1X 0,1% *Tween*-20 + 5% *nonfat dry milk*) e incubata *overnight* a +4°C con l'Ab I anti-HA(12CA5) mouse 1:3000 (*Roche*), che non riconosce KDM4A/4C endogeni ma solo l'iperespresso taggato con un peptide sintetico HA, diluito in PBS 1X 0,1% *tween*-20 + 5% *nonfat dry milk*. Terminata l'incubazione, sono stati fatti 3 lavaggi da 5' ciascuno in agitazione con PBS 1X 0,1% *tween*-20. A questo punto è stato aggiunto l'Ab II mouse (*Sigma*), diluito 1:10.000 in PBS 1X 0,1% *tween*-20. La membrana è stata incubata per 1h a temperatura ambiente e lavata 3 volte per 10' sempre in agitazione in PBS 1X 0,1% *tween*-20. La membrana

è stata sviluppata usando la camera Kodak *image station* 2000 secondo la metodica precedentemente descritta. A questo punto, la membrana è stata strippata e reincubata con l'Ab I anti-PLCβ1 1:1000 rabbit (*Santa Cruz*).

13. MICROARRAY

L'analisi del profilo di espressione genica nelle THP-1 silenziata per la PLCβ1 o per KDM4A o KDM4C è stata condotta mediante esperimenti di Microarray.

Le THP-1 sono state silenziata per ciascun enzima, singolarmente, mediante trasduzione lentivirale. Trascorsi 7 giorni dalla trasfezione, l'RNA totale è stato estratto dalle cellule silenziata, convertito a cDNA e contemporaneamente marcato con una sonda fluorescente, mediante il kit per microarray *Illumina Whole-Genome Gene Expression BeadChips (Illumina's BeadArray™)* e processato per l'analisi. I dati sono stati acquisiti ed analizzati presso l'Istituto Nazionale Genetica Molecolare, INGM a Milano (Italia) tramite il software *Illumina's GenomeStudio data analysis*.

14. VALIDAZIONE DEI MICROARRAY

L'andamento dell'espressione genica dei geni PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1, RGS16 e DHRS9 è stata validata mediante Real Time PCR. Le THP-1 sono state silenziata nelle stesse condizioni scelte per gli esperimenti di microarray, mediante trasduzione lentivirale. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule silenziata, convertito a cDNA e l'analisi dell'espressione genica è stata condotta tramite Real Time PCR.

15. IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA

Le THP-1 sono state silenziata per la PLCβ1 (#2) o per KDM4A (#5) e insieme al controllo SHX sono state processate per la X-ChIP (*cross-linked - Chromatin Immunoprecipitation*). 10⁷ THP-1 per condizione sono state lavate in PBS 1X e centrifugate a 1500 rpm per 5', due volte. Il *cross linking* delle proteine al DNA è stato ottenuto mediante l'utilizzo della formaldeide (*Sigma*) per fissare l'antigene al suo sito di legame sulla cromatina (*HighCell# ChIP kit; Diagenode*). Successivamente la cromatina è stata frammentata mediante sonicazione con il Bioruptor (*Bioruptor Sonication System; Diagenode*), con tre cicli di 10' (30'' *on* e 30'' *off*) *high* ottenendo frammenti di 100 / 150 bp. A questo punto il DNA è stato immunoprecipitato con l'Ab specifico per l'antigene d'interesse *overnight* a +4° in rotazione. Sono stati usati: 5µg dell'Ab anti-istone H3 trimetil K9 rabbit (*Active Motif*) che riconosce la trimetilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 (K9), 1µg dell'Ab anti-istone H3 trimetil K4 mouse (*Abcam*) che riconosce la trimetilazione dell'istone H3 sulla lisina 4 (K4), 1µg dell'Ab anti-H3K27me2/me3

mouse (*Active Motif*) che riconosce la metilazione dell'istone H3 sulla lisina 27 (K27) e 2µg dell'Ab anti-KDM4A rabbit (*Bethyl laboratories*). Come controllo negativo IgG rabbit o IgG mouse (*Diagenode*). Le fasi successive di *de-cross linking* e purificazione del DNA isolato sono state condotte seguendo i protocolli del *kit HighCell# ChIP kit* e del *kit Magnetic DNA Purification Kit for epigenetic applications (iPure kit v2; Diagenode)*. Una prima analisi è stata effettuata mediante amplificazione e quantificazione dei frammenti immunoprecipitati (Chip-qRT) per determinare l'eventuale presenza e quantità dei geni bersaglio. La qPCR è stata condotta usando la sonda *SYBR Green (Power up SYBR Green master mix; Applied Biosystem)* e la sequenza dei primer specifici, 1000 bp nell'intorno del *Transcription Starting Site* (TSS) dei geni bersaglio HOXA9 e MEF2C. Come controllo interno *standard*, sono stati usati i primer per la GADPH. La quantificazione relativa, rispetto al controllo (*fold change*) è stata stimata in base alla percentuale dell'input (% input). L'input corrisponde all'1% dei campioni immunoprecipitati. La % input è stata calcolata con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, in cui il $\Delta\Delta Ct$ corrisponde alla differenza fra il Ct del campione immunoprecipitato e il Ct dell'input corretto. Il Ct dell'input corretto è ottenuto dalla differenza tra il Ct dell'input e Log2 in base 100 (quando l'input corrisponde all'1% come nei nostri esperimenti).

16. TRASFORMAZIONE DEI BATTERI

Il DNA plasmidico è stato amplificato mediante trasformazione batterica, all'interno di ceppi attenuati di E.Coli (*stable 3One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent E. coli*). I batteri sono stati trasformati attraverso *shock* termico, secondo il seguente protocollo. I batteri sono stati scongelati in ghiaccio e incubati sempre in ghiaccio per 30' insieme a 100 ng di DNA. Trascorso questo tempo, per generare uno *shock* termico e permettere l'apertura dei pori sulla membrana batterica che consentirà l'ingresso del DNA, i batteri sono stati incubati per 1 minuto a 42°C e immediatamente ritrasferiti in ghiaccio per 3 minuti. Questo passaggio consente la chiusura dei pori. A questo punto, sono stati aggiunti 500 µl di SOC-medium (*Sigma*) ai batteri trasformati e sono stati incubati a 37°C, per 30 minuti in agitazione. Questo periodo di incubazione consente ai batteri di crescere e di iniziare ad esprimere la resistenza all'ampicillina che hanno acquisito grazie alla trasformazione. A questo punto, i batteri sono stati piastrati nelle petri contenenti terreno semisolido LB-Agar (*Sigma*) con aggiunto l'antibiotico ampicillina alla concentrazione di 0,05 µg/µl ed incubati a 37°C *overnight*. Il giorno successivo, è stata prelevata una singola colonia batterica, ed è stata messa a crescere a 37°C in agitazione in 5 ml di terreno liquido, TERRIFIC-BROTH (*Sigma*) per l'intera giornata e poi trasferita in un volume maggiore (200 ml) e lasciata crescere *overnight* a 37°C in agitazione con ampicillina alla concentrazione di 0,05 µg/µl. Dai batteri cresciuti è stato estratto il DNA plasmidico

mediante *kit* di estrazione del DNA *NucleoBond® Xtra Midi / Maxi* (Macherey Nagel). Il DNA estratto è stato quantificato con il NanoDrop.

17. ANALISI STATISTICA

Ogni esperimento è stato replicato almeno tre volte e i risultati sono espressi come media dei valori ottenuti nei singoli test. L'analisi statistica dei dati è stata svolta utilizzando il programma di analisi dati GraphPad Prism 6, mediante t test o Anova-Bonferroni t test. Valori di $P \leq 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

RISULTATI

CONTROLLO DEL SILENZIAMENTO DELLA PLC β 1

Per studiare il ruolo della fosfolipasi C β 1 nella LAM, la PLC β 1 è stata silenziata nella linea cellulare di Leucemia Mieloide Acuta Monocitica THP-1 mediante trasfezione lentivirale, secondo il metodo precedentemente descritto.

Espressione genica della PLC β 1

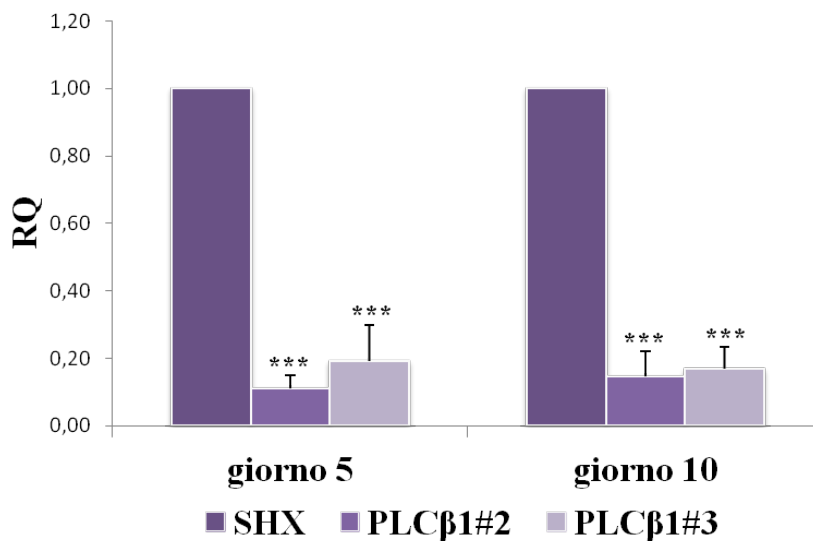


Fig.13 Real Time PCR condotta sulla linea THP-1 silenziata per la PLC β 1 dopo 5 e 10 giorni dalla trasfezione: la PLC β 1 è stata silenziata nelle THP-1 utilizzando l' #2 e l' #3. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. L'entità del silenziamento è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall' mRNA estratto dalle THP-1 a 5 e 10 giorni dopo la trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GAPDH.

L'espressione della PLC β 1 risulta significativamente ridotta nelle THP-1 silenziata, sia per l' #2 che per l' #3. La percentuale di silenziamento è pari al 90% (***) ($P \leq 0,001$) in entrambe le condizioni, rispetto al controllo (SHX) già al giorno 5. E' importante sottolineare che il silenziamento lentivirale si mantiene costante e stabile nel tempo, anche a 10 giorni dalla trasfezione.

Successivamente è stata controllata, tramite Western Blot, anche l'espressione a livello proteico della PLC β 1 nelle THP-1 silenziata per questo enzima.

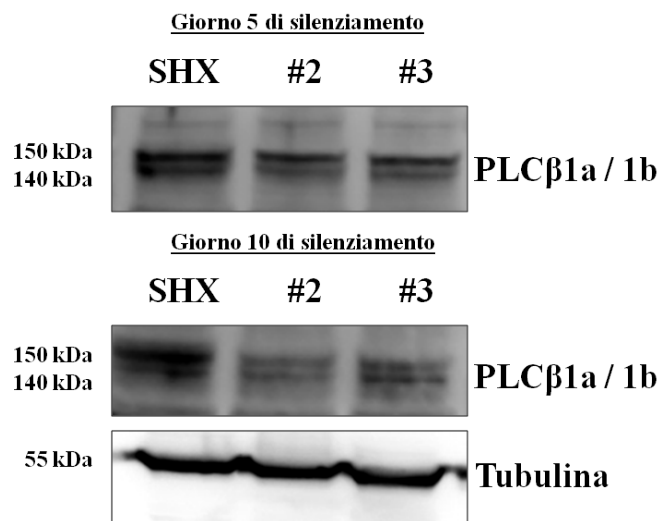


Fig.14 *Western Blot* condotto sulla linea THP-1 dopo 5 e 10 giorni dal silenziamento della PLCβ1: le THP-1 sono state silenziate per entrambi gli oligo della PLCβ1 (#2 e #3). Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Le THP-1 sono state lisate a 5 e 10 giorni dopo la trasfezione e l'espressione di entrambe le isoforme della PLCβ1 (PLCβ1a e PLCβ1b) è stata studiata. Come controllo endogeno standard è stata valutata anche l'espressione della Tubulina.

Come mostrato in figura 14, nelle THP-1 silenziate per PLCβ1, l'intensità delle bande per entrambe le isoforme diminuisce in modo significativo già a 5 giorni dal silenziamento. Questo calo d'espressione diventa più evidente al giorno 10, dando ulteriore conferma al dato ottenuto in Real Time PCR, secondo cui la trasfezione mediante lentivirus permette di ottenere un silenziamento stabile, che viene trasmesso alle cellule figlie. Tuttavia, anche a 10 giorni permane della proteina residua. Questo potrebbe essere dovuto a un prolungato *turnover* della proteina già presente, che però non è noto.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DELLA PLCβ1

Studi precedenti (dati non ancora pubblicati) all'interno del gruppo di ricerca in cui mi sono inserita, hanno dimostrato che il silenziamento della PLCβ1 induce una importante diminuzione della crescita dei blasti leucemici sia murini che umani nella LAM, *in vitro*. Pertanto, gli effetti di questo silenziamento e i meccanismi attraverso i quali si esplica sono stati valutati più approfonditamente. Gli esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare THP-1 silenziate per la PLCβ1. E' stato valutato l'effetto sulla crescita cellulare, sull'apoptosi e anche sull'espressione di geni implicati nella patogenesi della LAM.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO

SAGGIO CLONOGENICO

Gli effetti del silenziamento della PLC β 1 sulla capacit  delle cellule leucemiche di formare colonie da una singola cellula sono stati studiati mediante saggio clonogenico nelle THP-1 silenziate per la PLC β 1.

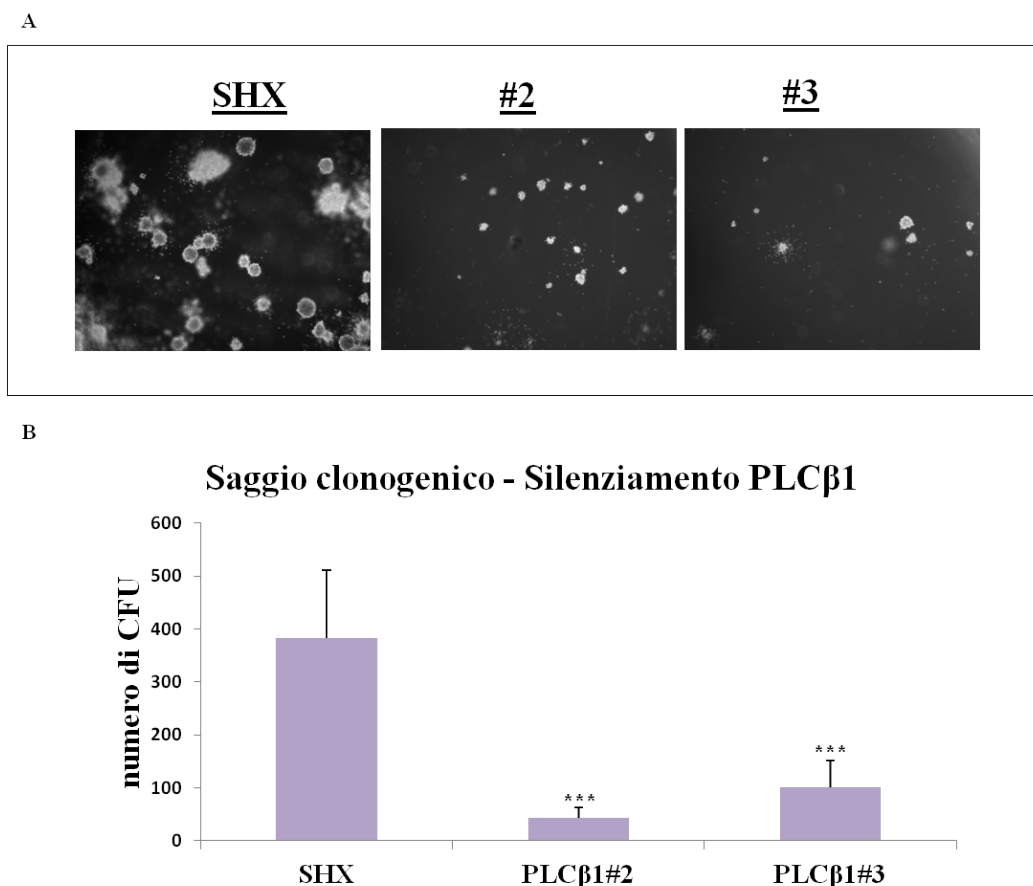


Fig.15A e 15B Saggio clonogenico condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLC β 1 dopo 10 giorni dalla semina in terreno methocult: le THP1 sono state silenziate per la PLC β 1, sia con #2 che con #3, e sono state seminate in methocult, 48 ore dopo la trasfezione. Come controllo   stato utilizzato il vettore SHX. Le cellule sono state incubate a 37 C, 5% CO2. Trascorsi 10 giorni dalla semina il numero di colonie (CFU - unit  formanti colonia)   stato contato al microscopio ottico.

Le immagini (figura 15A) mostrano come la capacit  di formare colonie delle THP-1 risulta essere significativamente ridotta, rispetto al controllo, quando la PLC β 1   silenziata, sia per l' #2 che per l' #3. Quello che si osserva (figura 15B)   un importante calo del numero di CFU,

passando da una media di 383 CFU per il controllo a 43 CFU ($***P \leq 0,001$) per l'#2 e 101 ($***P \leq 0,001$) per l'#3.

CRESCITA COMPETITIVA

La valutazione della capacità proliferativa delle cellule leucemiche, quando la PLC β 1 è silenziata, è stata condotta anche mediante crescita competitiva tra le THP-1 silenziata per la PLC β 1 e delle THP-1 trasfettate per esprimere GFP.

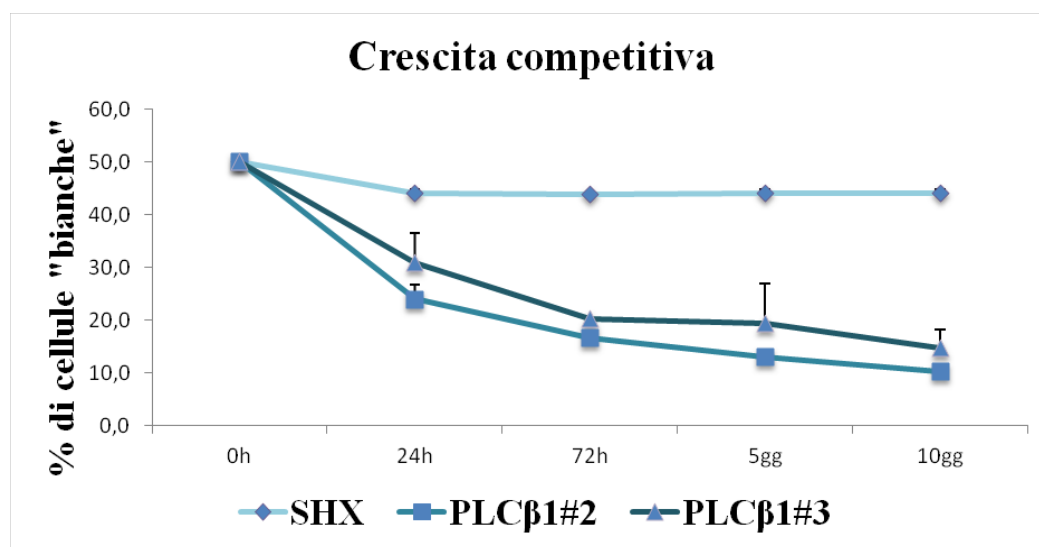


Fig.16 *Crescita competitiva condotta sulla linea THP-1 silenziata per la PLC β 1 a 24 ore, 72 ore, 5 giorni e 10 giorni dalla semina: le THP1 sono state o silenziata per la PLC β 1 (#2 e #3) o trasfettate per esprimere GFP. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Queste due popolazioni di cellule, sono state seminate assieme in percentuale uguale, nello stesso pozzetto (50% + 50%). La frazione di THP-1 marcate GFP presenti all'interno di questo pool cellulare è stata misurata a diversi tempi, tempo 0, 24 ore, 72 ore, 5 giorni e 10 giorni dalla semina, tramite acquisizione al citofluorimetro.*

Nel grafico (figura 16) è riportata la percentuale delle cellule silenziata per la PLC β 1 presenti all'interno del *pool* cellulare, rispetto al controllo SHX. Questa percentuale è stata ricavata da quella delle THP-1 marcate GFP e misurata a tempi diversi. La percentuale delle THP-1 silenziata, sia per l'#2 che per l'#3 cala progressivamente nel tempo, al contrario del controllo SHX che invece si mantiene costante (50% del *pool* cellulare), rispetto alla frazione di THP-1 marcate GFP. Già a 24 ore la percentuale di THP-1 silenziata risulta essere ridotta della metà ($*P \leq 0,05$), rispetto alle THP-1 marcate GFP, fino a ridursi ad un 10% al giorno 10 ($***P \leq 0,001$). Questo dimostra che il silenziamento della PLC β 1 è capace di ridurre il potenziale di crescita incontrollata delle cellule neoplastiche.

VALUTAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Da letteratura, la PLC β 1 ricopre un ruolo molto importante nella regolazione della progressione attraverso la fase G₀/G₁ del ciclo cellulare e la transizione G₂/M. Per questo motivo, è stato valutato nelle THP-1 silenziate per la PLC β 1 quali fossero le conseguenze di questo silenziamento sia sul ciclo cellulare sia su alcune delle sue proteine regolatrici, pRbser780, pRbser807/811, p21, p27.

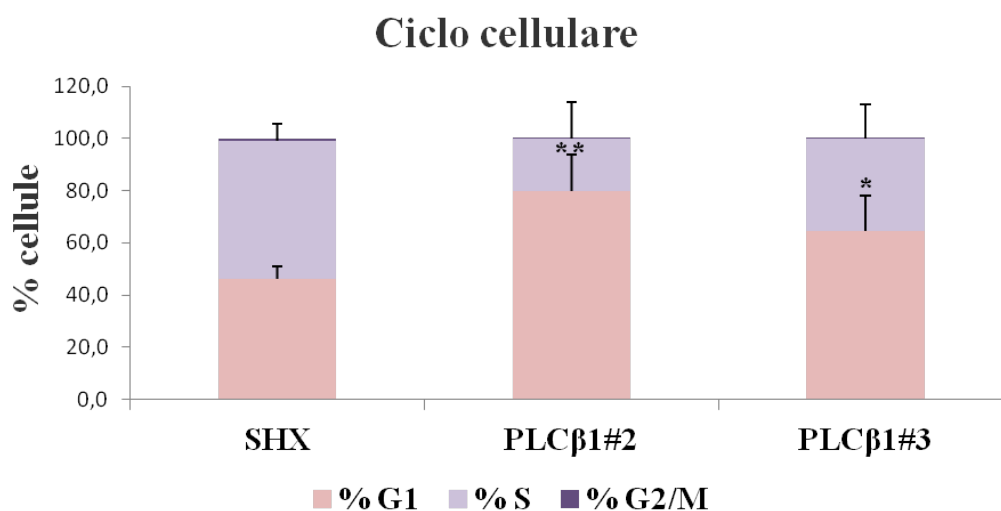


Fig.17 *Analisi del ciclo cellulare condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLC β 1 a 5 giorni dalla trasfezione: le THP-1 sono state silenziate per la PLC β 1 sia con #2 che #3. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Il ciclo cellulare è stato valutato a 5 giorni dalla trasfezione mediante acquisizione al citofluorimetro.*

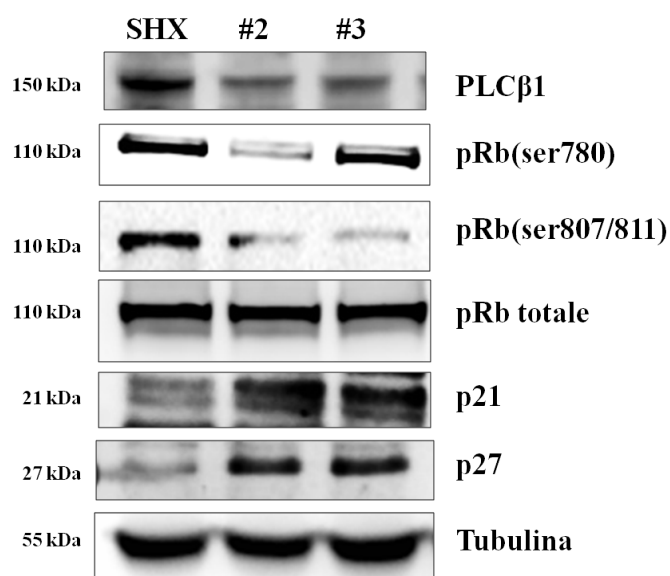


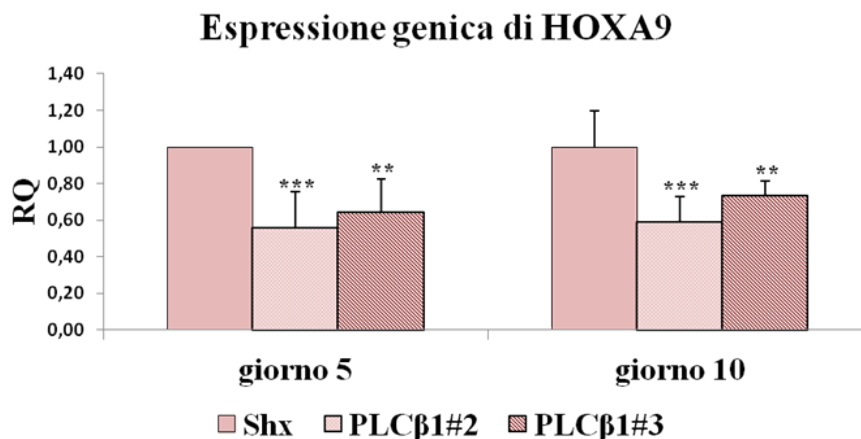
Fig.18 Western Blot condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLCβ1 a 5 giorni dalla trasfezione: le THP-1 sono state silenziata per la PLCβ1 sia con #2 che #3. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Le THP-1 sono state lisate a 5 giorni dalla trasfezione e l'espressione di pRbser780, pRbser807/811, p21, p27 è stata studiata. Come controllo endogeno standard è stata valutata anche l'espressione della Tubulina.

La figura 17 mostra come il silenziamento della PLCβ1 sia capace di indurre un arresto importante in fase G₀/G₁ delle THP-1 silenziata, già a 5 giorni di silenziamento, con una percentuale di cellule in fase G₀/G₁ pari all'80% per l'#2 (**P≤0,01). Questo blocco proliferativo è causato da una modulazione dell'espressione della forma fosforilata della proteina del retinoblastoma, di p21 e p27. Quando la PLCβ1 è silenziata (figura 18), l'espressione di pRb(ser780) e di pRb(ser807/811) diminuisce significativamente rispetto al controllo, ad indicare un suo stato di attivazione che gli consente di legare e sequestrare il fattore di trascrizione E2F. Allo stesso tempo, anche gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti p21 e p27 risultano attivate in quanto la loro espressione aumenta notevolmente, rispetto ad SHX. Il silenziamento della PLCβ1 quindi, impedisce alle THP-1 di progredire attraverso il ciclo cellulare, in quanto porta a un'attivazione di quei fattori responsabili della sua inibizione.

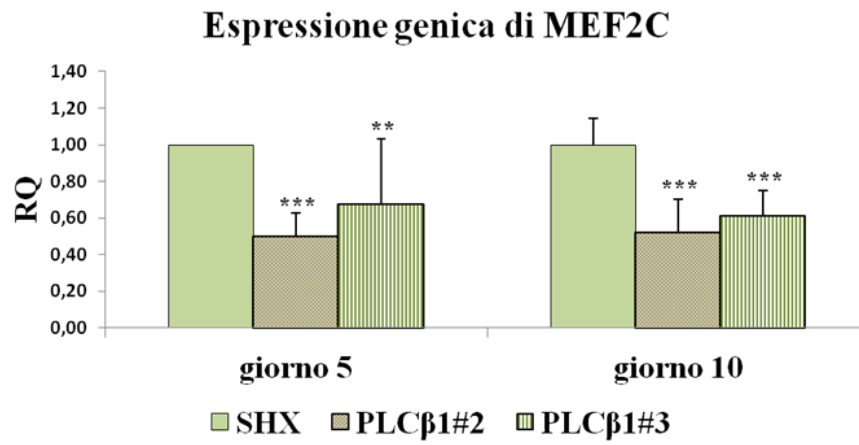
ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI HOXA e MEF2C

Successivamente, alla luce dei risultati soddisfacenti ottenuti sul diretto coinvolgimento della PLCβ1 nei meccanismi proliferativi della LAM, è stata investigata la sua potenziale implicazione nell'espressione di quelli che sono i fattori responsabili della crescita incontrollata dei blasti leucemici, fra cui i geni HOXA (HOXA9 e HOXA7), MEF2C, e i loro geni bersaglio (PUO6F, SNA1, ELK1), nella LAM caratterizzata dalla traslocazione del gene MLL.

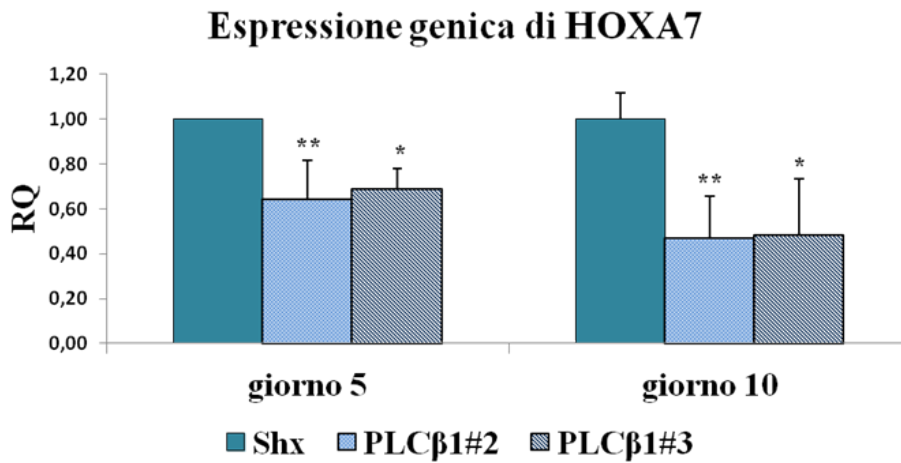
A



B



C



D

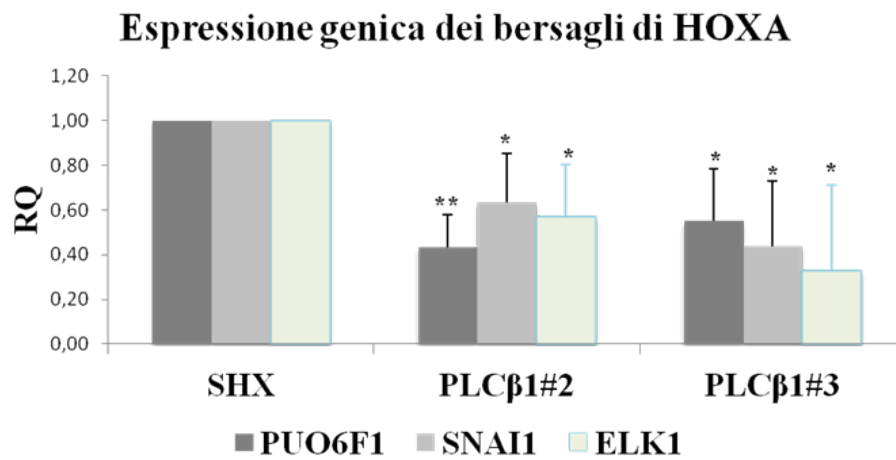


Fig.19A, 19B, 19C Real Time PCR condotta sulla linea THP-1 dopo 5 e 10 giorni dal silenziamento della PLCβ1: la PLCβ1 è stata silenziata nelle THP-1 utilizzando l'#2 e l'#3.

Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. L'espressione dei geni HOXA9, HOXA7, MEF2C è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 a 5 e 10 giorni dalla trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GADPH. **Fig.19D Real Time PCR condotta sulla linea THP-1 dopo 5 giorni dal silenziamento della PLCβ1:** la PLCβ1 è stata silenziata nelle THP-1 utilizzando l'#2 e l'#3. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. L'espressione dei geni PUO6F1, SNAI1 e ELK1 è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 a 5 giorni dalla trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GADPH.

Di notevole rilevanza, il silenziamento della PLCβ1 induce un calo importante dell'espressione dei geni HOXA e di MEF2C (figura 19A, 19B, 19C). Quando la PLCβ1 è silenziata sia per #2 che #3, l'espressione di HOXA9, HOXA7 e MEF2C è ridotta quasi della metà già al giorno 5, rispetto al controllo SHX. Questa riduzione non è transitoria, ma si mantiene costante e stabile nel tempo anche a 10 giorni dal silenziamento. Per esempio, per #2 questa diminuzione di espressione è pari al 40% per HOXA9 (**P≤0,001), al 50% per HOXA7 (**P≤0,01) e al 50% per MEF2C (**P≤0,001). Allo stesso modo, anche l'espressione di altri fattori di trascrizione (PUO6F1, SNAI1 e ELK1), a loro volta coinvolti nella patogenesi della LAM in quanto bersagli dei geni HOXA, è influenzata dal silenziamento della PLCβ1. Come mostrato in figura 19D, quando la PLCβ1 è silenziata, quello che si osserva è una diminuzione significativa di tutti e tre i geni analizzati (*P≤0,05).

Il silenziamento della PLCβ1 induce quindi una inibizione dell'espressione genica a cascata, sull'espressione di geni chiave per la progressione della leucemia mieloide acuta, e di conseguenza sui loro geni bersagli.

INIBIZIONE DELLA FOSFOLIPASI C CON U73122

Per dimostrare che gli effetti antiproliferativi osservati con il silenziamento della PLCβ1 fossero dovuti alla perdita di una funzione di questo enzima e non ad una sua caratteristica strutturale, le THP-1 sono state trattate con l'inibitore specifico per la Fosfolipasi C, U73122. Quest'ultimo impedisce che il PI_(4,5)P₂ venga idrolizzato in IP₃ e che vi sia rilascio di Ca²⁺ dalle riserve intracellulari.

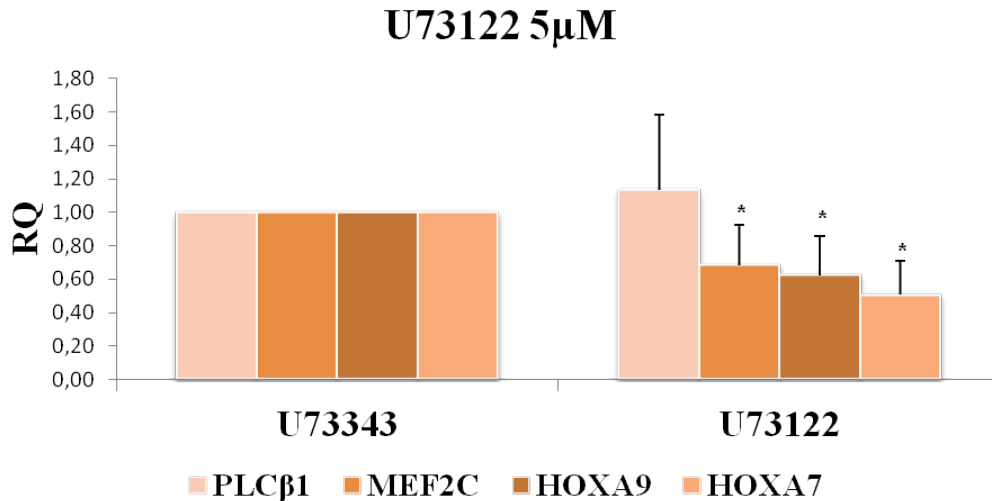


Fig.20 *Real Time PCR* condotta sulla linea THP-1 dopo 48 ore di trattamento con l'inibitore specifico per la Fosfolipasi C, U73122: le THP-1 sono state trattate con l'inibitore specifico per la fosfolipasi C, U73122 alla concentrazione di 5 μ M. Come controllo è stato utilizzato il suo analogo inattivo U73343. L'espressione dei geni HOXA9, HOXA7 e MEF2C è stata controllata attraverso Real Time PCR a 48 ore dal trattamento. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GADPH.

Quando l'attività enzimatica della PLC β 1 è inibita, gli effetti ottenuti sull'espressione dei geni HOXA e MEF2C, sono gli stessi di quelli osservati in seguito al suo silenziamento lentivirale. L'espressione di HOXA9, HOXA7 e MEF2C diminuisce significativamente rispetto al controllo (*P \leq 0,05). Questo dimostra che la ridotta espressione dei geni HOXA e di MEF2C, ottenuta dal silenziamento della PLC β 1, è dovuta alla mancata attività della PLC β 1, e non alle sue caratteristiche strutturali, in grado magari di avvicinare giocatori diversi in un unico complesso.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROAPOPTOTICO

Il blocco proliferativo non è l'unico meccanismo antineoplastico indotto in seguito al silenziamento della PLC β 1. E' stato osservato che il silenziamento di questo enzima è capace di attivare tardivamente un programma di morte cellulare nelle THP-1 silenziate per la PLC β 1.

Lo studio sul potenziale effetto pro-apoptotico del silenziamento della PLC β 1 nella LAM è stato condotto sia mediante saggi apoptotici sulle THP-1 silenziate per la PLC β 1, sia andando a valutare l'espressione di quelle proteine (Procaspasi8 e PARP1) che vengono attivate durante gli eventi di apoptosi caspasi dipendente.

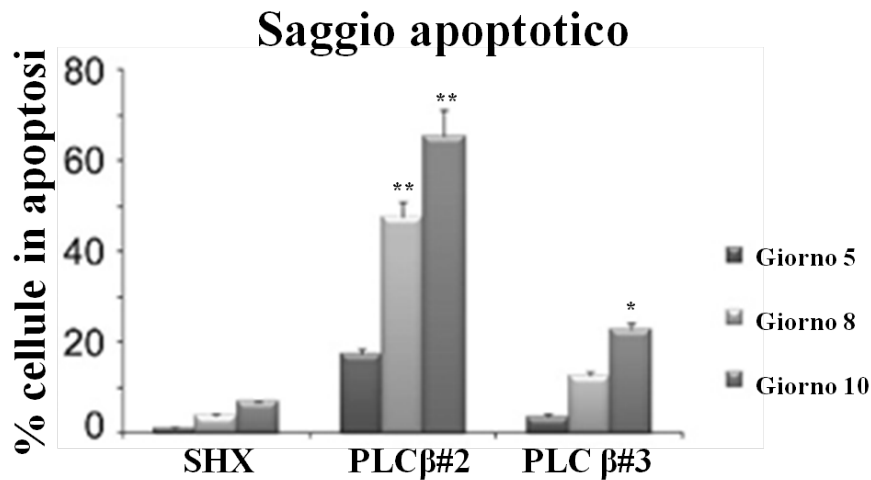


Fig.21 Saggio apoptotico condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLCβ1 a 10 giorni dalla trasfezione: le THP-1 sono state silenziata per la PLCβ1 sia con #2 che #3. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. L'apoptosi è stata valutata a 5, 8 e 10 giorni dalla trasfezione, mediante marcatura con Annessina V- FITC e acquisizione al citofluorimetro.

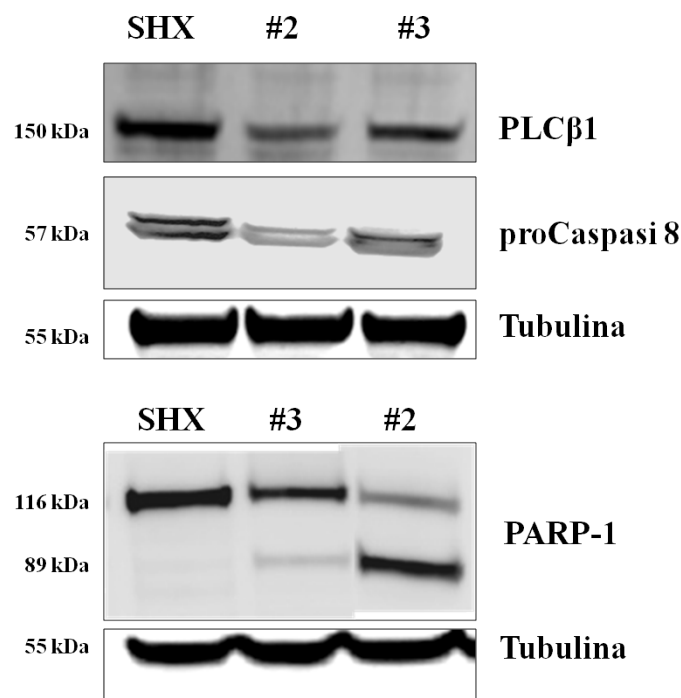


Fig.22 Western Blot condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLCβ1 a 10 giorni dalla trasfezione: le THP-1 sono state silenziata per la PLCβ1 sia con #2 che #3. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Le THP-1 sono state lisate a 10 giorni dalla trasfezione e l'espressione della proCaspasi8 e di PARP1 è stata studiata. Come controllo endogeno standard è stata valutata anche l'espressione della Tubulina.

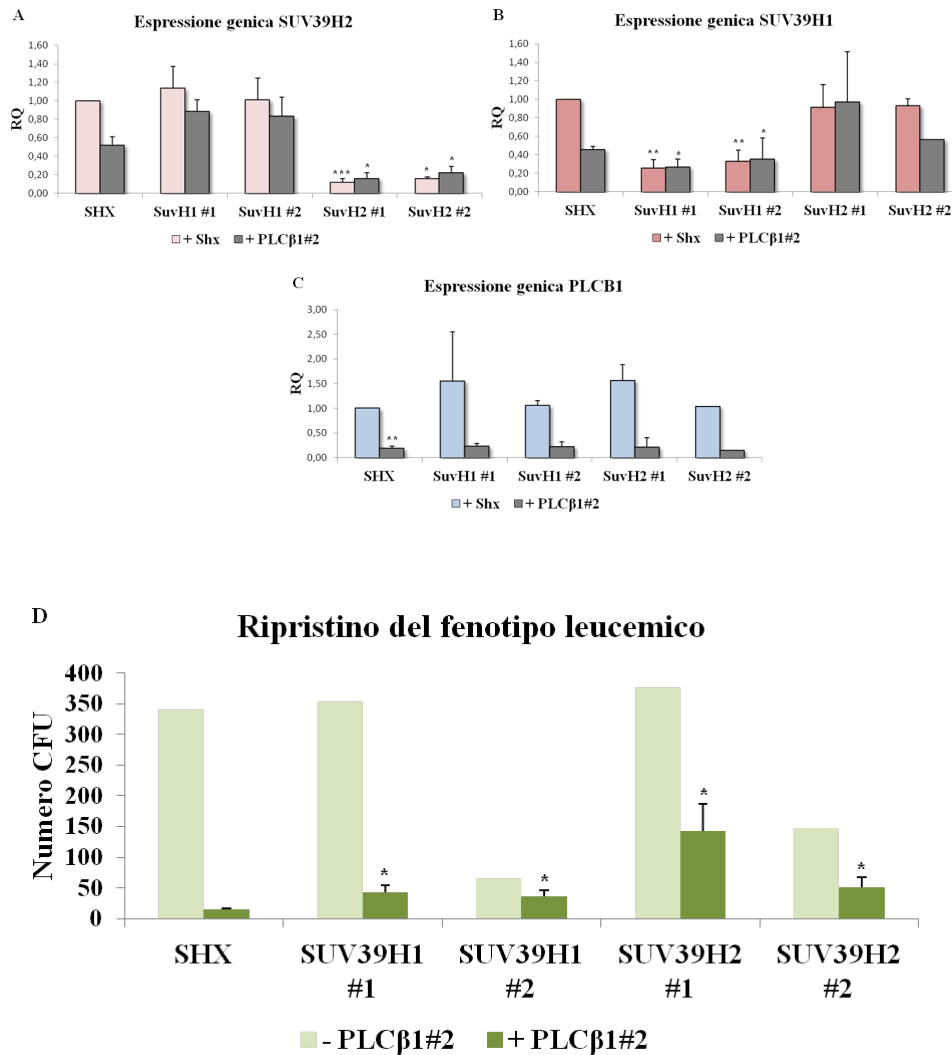
In figura 21 è mostrato come il silenziamento della PLC β 1 nelle THP-1 sia capace di indurre apoptosi con una significativa percentuale di cellule in apoptosi rispetto al controllo SHX. Questo effetto si è verificato solo successivamente al blocco proliferativo e dopo un tempo prolungato di almeno 10 giorni. Questo meccanismo apoptotico è caspasi dipendente, come dimostrato in figura 22. Sia per #2 che #3 l'espressione della forma inattiva della Caspasi 8, ossia la proCaspasi 8, diminuisce significativamente quando la PLC β 1 è silenziata, ad indicare una sua attivazione mediante clivaggio della proteina. A valle di questa cascata di segnali si trova PARP1, il cui clivaggio e conseguente inattivazione, permette l'inizio degli eventi apoptotici. In entrambi gli oligo, la forma attiva di PARP1 diminuisce rispetto al controllo SHX quando la PLC β 1 è silenziata. Mentre aumenta l'espressione del frammento più piccolo, clivato.

L'insieme di queste evidenze sperimentali ha permesso di riconfermare quanto già osservato nei dati preliminari, ma non solo. In particolare, questi risultati dimostrano l'implicazione diretta della PLC β 1 nei meccanismi di crescita della LAM, e che la sua inibizione è sufficiente ad arrestare almeno in parte questi fenomeni proliferativi. La PLC β 1 agisce direttamente su quei fattori coinvolti nei meccanismi di progressione del ciclo cellulare e, ancora più importante, influenza direttamente l'espressione di geni indispensabili per l'insorgenza e il mantenimento della LAM.

Da letteratura, l'alterata espressione dei geni HOXA e di MEF2C nella LAM è indotta da altrettanti alterati meccanismi di controllo epigenetici. Nello specifico, quello che si osserva è la presenza di aberranti fenomeni di metilazione o acetilazione delle code degli istoni, in particolare a livello dei promotori. Poiché la PLC β 1 sembra avere un importante effetto nel controllo dell'espressione di questi geni, è stato successivamente indagato come questa regolazione potesse avvenire, e quindi se la PLC β 1 fosse a sua volta direttamente o indirettamente coinvolta in questi meccanismi epigenetici di modulazione dello stato della cromatina. Questa valutazione è stata inizialmente condotta studiando quali fossero gli effetti del suo silenziamento in presenza o assenza di alcuni fattori, SUV39H1, SUV39H2 e SIRT1. Quest'ultimi sono responsabili in condizioni normali di silenziamento genico dei geni HOXA, in quanto capaci di deacetilare e allo stesso tempo metilare l'istone 3 sulla lisina 9 (H3K9) a livello del loro promotore.

SILENZIAMENTO DI SUV39H1 E SUV39H2 NELLE THP-1 SILENZIATE PER LA PLCB1: RIPRISTINO DEL FENOTIPO LEUCEMICO

Da studi *in vitro* precedenti (non ancora pubblicati) è emerso che, silenziando tutte le possibili istone metilasi (mediante una libreria di *shRNA*) nei blasti leucemici, in concomitanza con il silenziamento della PLCβ1, vi era un ripristino della capacità proliferativa delle cellule neoplastiche. In particolare, tra tutte le metilasi studiate, era il doppio silenziamento dei blasti con SUV39 insieme alla PLCβ1 a portare a un parziale ripristino della crescita cellulare. Pertanto, per studiare la presenza di una potenziale relazione tra la PLCβ1 e SUV39H1 o SUV39H2 nell'espressione dei geni HOXA, sono stati condotti esperimenti di ripristino del fenotipo leucemico nelle THP-1.



Le THP1 sono state doppiamente silenziate, per la PLCβ1 (#2) e per i due oligo (#1 e #2) di SUV39H1 o per i due oligo (#1 e #2) di SUV39H2. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Fig.23A, 23B, 23C Real Time PCR condotta sulla linea THP-1 silenziata per la PLCβ1 insieme a SUV39H1 o SUV39H2 48 ore dopo la trasfezione: l'espressione dei geni PLCβ1, SUV39H1 e SUV39H2 è stata controllata attraverso Real Time PCR per tutte le condizioni studiate a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 silenziate a 48 dalla trasfezione con SUV39. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GADPH. Fig.23D Saggio clonogenico condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLCβ1 insieme a SUV39H1 o SUV39H2, dopo 12 giorni dalla semina in methocult: le THP1 silenziate sono state seminate in methocult, 48 ore dopo la trasfezione. Le cellule sono state incubate a 37°C, 5% CO2. Trascorsi 12 giorni dalla semina il numero di colonie (CFU - unità formanti colonia) è stato contato al microscopio ottico.

La figura 23D mostra che se la PLCβ1 è silenziata correttamente insieme a SUV39H1 o SUV39H2 (figura 23A, 23B, 23C), l'effetto antiproliferativo ottenuto dal solo silenziamento della PLCβ1 viene parzialmente perso. Il grafico mostra che, in presenza del doppio silenziamento, le THP-1 riacquistano almeno in parte la capacità di formare colonie, rispetto alle THP-1 silenziate solo per la PLCβ1. Si passa per esempio, da una media di 16 CFU per PLCβ1#2 a 42 CFU (*P≤0,05) per PLCβ1#2 + SUV39H1#1 e a 143 CFU (*P≤0,05) per PLCβ1#2 + SUV39H2#1.

Questi risultati dimostrano il potenziale coinvolgimento della PLCβ1 nei processi di modulazione della metilazione dell'istone 3 sulla lisina 9 (H3K9), probabilmente andando ad antagonizzare il silenziamento genico indotto dalla metilazione da parte di SUV39. Per cui, la ridotta espressione dei geni HOXA osservata in assenza della PLCβ1, potrebbe essere dovuta ad un incremento della metilazione di H3K9 (H3K9me3) sul promotore di questi geni, causata proprio dalla mancanza di questo enzima.

ATTIVAZIONE DI SIRT1 NELLE THP-1

SUV39 è richiamato al promotore dei geni HOXA, da parte di SIRT1, una deacetilasi che rimuove i gruppi acetili, per permettere la metilazione degli istoni, con conseguente repressione della trascrizione genica. Pertanto, vista la stretta relazione tra SUV39 e la PLCβ1, e visto l'importante ruolo di SIRT1 come oncosoppressore in numerose forme tumorali, è stato successivamente indagato se la combinazione tra l'attivazione di SIRT1 e la PLCβ1 potesse in qualche modo incrementare il potenziale effetto antineoplastico ottenuto con il solo silenziamento della PLCβ1 nella LAM.

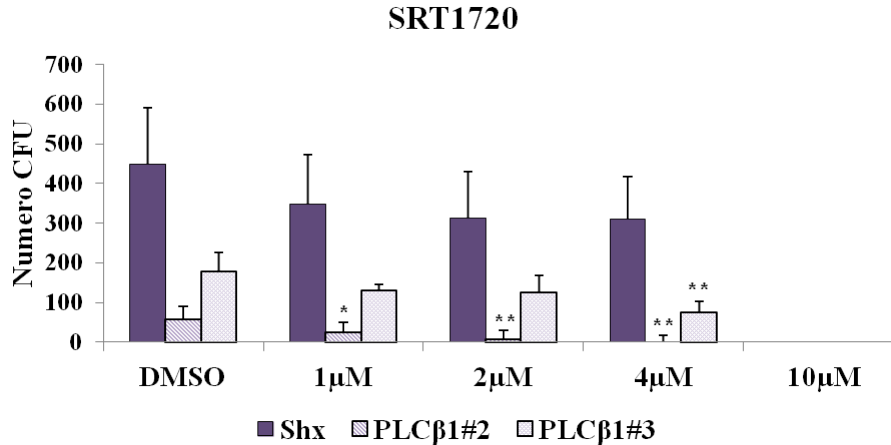


Fig.24 Saggio clonogenico condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLCβ1 e trattata a dosi crescenti di SRT1720 (0 μM , 1 μM, 2 μM, 4 μM e 10 μM) a 10 giorni dalla semina in methocult: le THP-1 sono state silenziate per la PLCβ1 (#2 e #3) e 48 ore dopo la trasfezione sono state trattate con dosi crescenti di SRT1720, attivatore allosterico di SIRT1, alla concentrazione di 1 μM, 2 μM, 4 μM e 10 μM. Per lo 0 μM è stato usato il DMSO. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Le cellule sono state incubate a 37°C, 5% CO₂. Trascorsi 10 giorni dalla semina il numero di colonie (CFU - unità formanti colonia) è stato contato al microscopio ottico.

L'attivazione di SIRT1 nelle THP-1 silenziate per la PLCβ1, aumenta in modo significativo il blocco proliferativo ottenuto con il solo silenziamento della fosfolipasi C β1 nelle cellule neoplastiche. Il trattamento con SRT1720 da solo, non sembra avere un effetto importante sulla capacità delle THP-1 controllo di formare colonie, con nessuna delle concentrazioni testate (ad eccezione del 10 μM). Al contrario, trattando le THP-1 silenziate (#2) con l'attivatore per SIRT1, il numero delle colonie si riduce maggiormente già alla concentrazione più bassa (1 μM *P≤0,05), rispetto al numero ottenuto silenziando solo la PLCβ1. L'andamento è crescente e proporzionale all'aumentare della concentrazione di SRT1720. A concentrazione maggiore dell'attivatore SRT1720, questo effetto risulta essere ancora più pronunciato (4 μM **P≤0,01) con un numero di CFU pari a zero per #2. Pertanto, l'attivazione di SIRT1 sembra avere un effetto sinergico con il silenziamento della PLCβ1, nell'arrestare la proliferazione delle THP-1. Questo meccanismo, potrebbe essere ricollegato al fatto che l'assenza della PLCβ1 favorisce la metilazione dell'istone H3K9 sul promotore dei geni HOXA, a cui si aggiunge l'azione deacetilasica di SIRT1, che promuoverebbe ulteriormente il silenziamento della trascrizione genica.

Alla luce di questi risultati, che vedono un' implicazione importante della PLC β 1 nei meccanismi epigenetici che regolano le modifiche nello stato di attivazione o inibizione della trascrizione dei geni HOXA, l'ipotesi è che ciò avvenga attraverso la modulazione da parte di questo enzima dell'attività di alcuni regolatori epigenetici. Pertanto, l'attenzione è stata focalizzata su altri due enzimi che da letteratura controllano la metilazione di H3K9 insieme a SUV39, ossia KDM4A e KDM4C. Si tratta di due demetilasi che hanno come bersaglio principale H3K9_{me3} e sono responsabili della rimozione dei gruppi metili, favorendo la trascrizione genica. Quello che è stato ipotizzato è che la PLC β 1 possa, direttamente o indirettamente interagire con KDM4A o KDM4C, e modularne la sua attività demetilasica, incrementandola. Pertanto, entrambi gli enzimi sono stati silenziati nelle THP-1, allo scopo di valutare quale fosse l'espressione fenotipica ottenuta, confrontandola con quella ottenuta silenziando la PLC β 1.

SILENZIAMENTO DI KDM4A e KDM4C NELLE THP-1

ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA: REAL TIME PCR

Le THP-1 sono state silenziate per KDM4A o KDM4C, mediante trasfezione lentivirale, secondo il metodo precedentemente descritto.

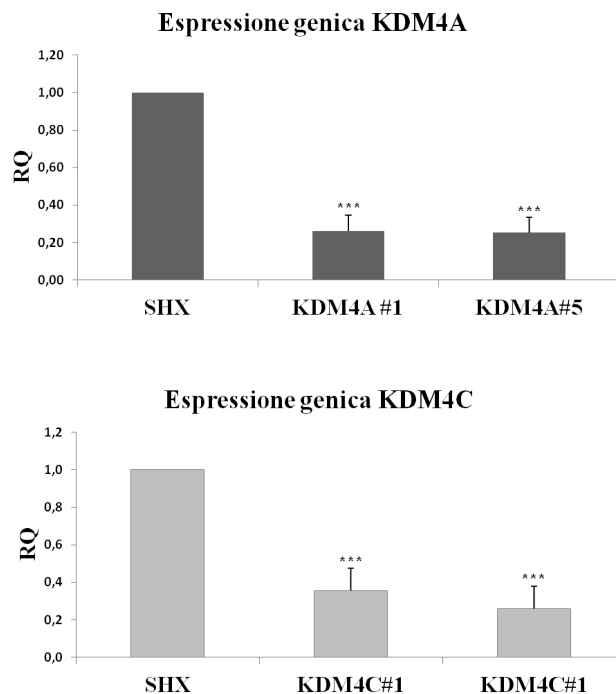


Fig.25 Real Time PCR condotta sulla linea THP-1 silenziate per KDM4A o KDM4C dopo 5 giorni dalla trasfezione: KDM4A o KDM4C sono stati silenziati nelle THP-1 utilizzando due oligo per ciascun enzima (#1 e #5). Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. L'entità del

silenzamento è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 a 5 giorni dalla trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GAPDH.

L'espressione sia di KDM4A che di KDM4C risulta significativamente ridotta nelle THP-1 silenziate, sia per l'#1 che per l'#5, con una media di silenziamento pari all'80% (***) $P \leq 0,001$, rispetto al controllo (SHX). Importante (dati non mostrati) è il fatto che il silenziamento lentivirale si mantiene costante e stabile nel tempo, anche a giorni successivi dalla trasfezione.

ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA: WESTERN BLOT

Successivamente è stata controllata, tramite Western Blot, anche l'espressione a livello proteico di KDM4A o di KDM4C nelle THP-1 silenziate per questi enzimi.

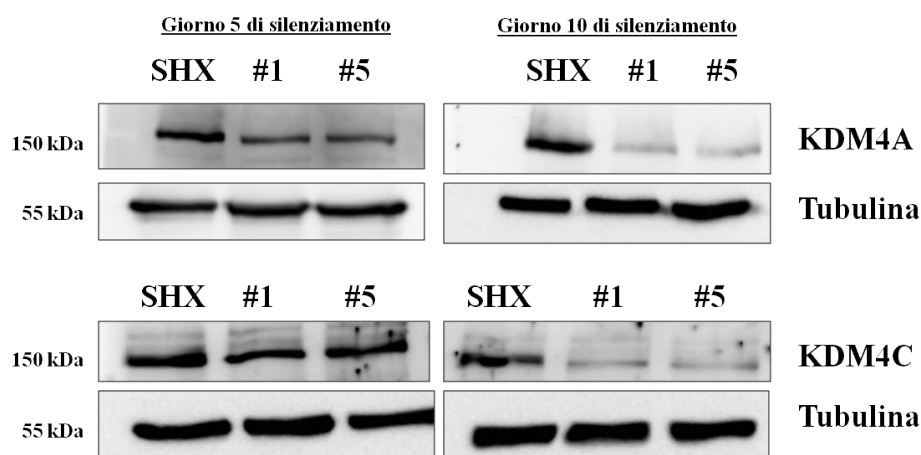


Fig.26 Western Blot condotto sulla linea THP-1 dopo 5 e 10 giorni dal silenziamento di KDM4A o KDM4C: le THP-1 sono state silenziate per entrambi gli oligo di KDM4A o KDM4C (#1 e #5). Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Le THP-1 sono state lisate a 5 e 10 giorni dalla trasfezione e l'espressione di KDM4A e di KDM4C è stata studiata. Come controllo endogeno standard è stata valutata anche l'espressione della Tubulina.

Come mostrato in figura 26, sia nelle THP-1 silenziate per KDM4A che KDM4C, l'intensità delle bande per entrambi gli oligo inizia a diminuire in modo significativo già a 5 giorni dal silenziamento. Questo calo d' espressione diventa ancora più evidente al giorno 10, rispetto al controllo SHX, ad indicare che le THP-1 sono state trasfettate stabilmente e che il silenziamento viene mantenuto nelle cellule figlie. Tuttavia, anche a 10 giorni permane della proteina residua. Questo è stato ipotizzato essere dovuto a un prolungato *turnover* della proteina già presente, che però non è noto.

STUDIO DEGLI EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI KDM4A E KDM4C

SAGGIO CLONOGENICO

Gli effetti del silenziamento di KDM4A o KDM4C sulla capacità delle cellule leucemiche di formare colonie, sono stati valutati mediante saggio clonogenico nelle THP-1 silenziate per queste due demetilasi.

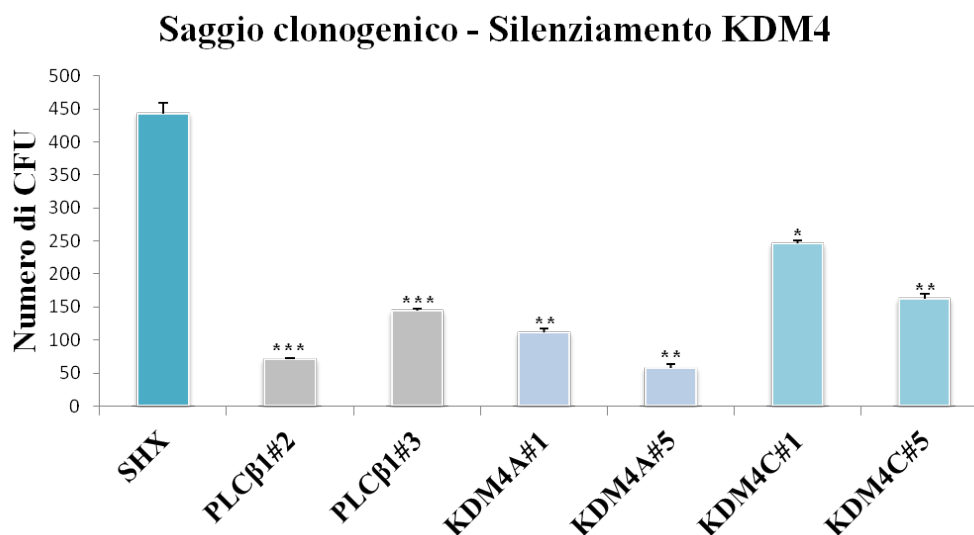


Fig.27 Saggio clonogenico condotto sulla linea THP-1 silenziate per PLCβ1 o KDM4A o KDM4C a 10 giorni dalla semina in methocult: le THP1 sono state silenziate o per KDM4A o KDM4C o per la PLCβ1, ciascun enzima con i suoi due rispettivi oligo, e sono state seminate in methocult, a 48 ore dalla trasfezione. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Le cellule sono state incubate a 37°C, 5% CO₂. Trascorsi 10 giorni dalla semina il numero di colonie (CFU - unità formanti colonia) è stato contato al microscopio ottico.

L'immagine (figura 27) mostra come la capacità di formare colonie delle THP-1 risulta essere significativamente ridotta, rispetto al controllo, quando KDM4A o KDM4C sono silenziate, per entrambi gli oligo. Quello che si osserva è un importante calo del numero di CFU, passando per esempio da una media di 443 per il controllo a 58 CFU (**P≤0,01) per l'#5 di KDM4A e a 162 CFU (**P≤0,01) per l'#5 di KDM4C. Ancora più importante è il fatto che questa diminuzione nel numero di colonie è estremamente simile a quella ottenuta silenziando la PLCβ1 nelle THP-1. Il silenziamento di KDM4A o KDM4C risulta pertanto in un fenotipo di crescita estremamente simile a quello ottenuto silenziando la fosfolipasi C β1.

Poiché il silenziamento di KDM4A o KDM4C porta ad una inibizione della proliferazione delle cellule leucemiche, così come si ottiene silenziando la PLC β 1 nelle THP-1, successivamente è stato indagato se questo parziale arresto della crescita cellulare fosse dovuto anche in questo caso ad una modulazione dell'espressione dei geni HOXA e MEF2C.

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI HOXA e MEF2C

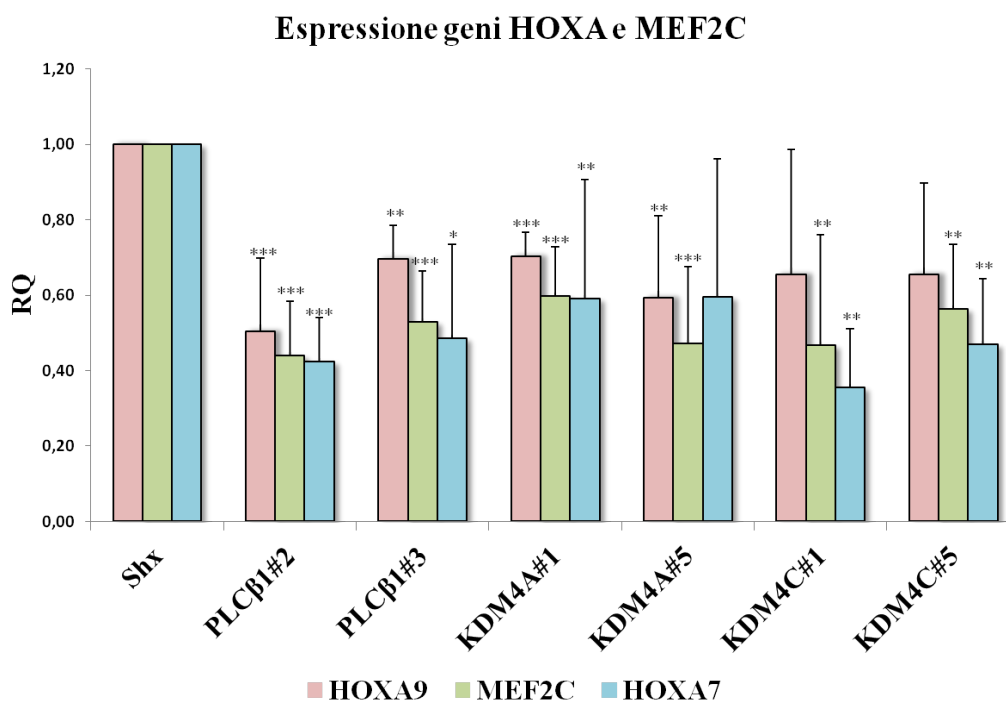


Fig.28 *Real Time PCR* condotta sulla linea THP-1 dopo 7 giorni dal silenziamento di **KDM4A, KDM4C o PLC β 1**: le THP-1 sono state silenziate per KDM4A con #1 e #5, KDM4C con #1 e #5 e anche per la PLC β 1 con #2 e #3. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. L'espressione dei geni HOXA9, HOXA7, MEF2C è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 a 7 giorni dalla trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GADPH.

Come atteso, silenziando KDM4A o KDM4C nelle THP-1, si ottiene una diminuzione importante dell'espressione dei geni HOXA e MEF2C (figura 28). Questo calo d' espressione è paragonabile a quello indotto dal silenziamento della PLC β 1 nelle stesse cellule. Infatti per ciascun enzima entrambi gli oligo (#1 o #5) arrivano quasi a dimezzare l'espressione di HOXA9, HOXA7 e MEF2C rispetto al controllo SHX (**P \leq 0,01).

Questi risultati hanno fatto ipotizzare la presenza di una relazione funzionale tra la PLCβ1 e KDM4A o KDM4C, a supporto dell'ipotesi che il blocco proliferativo indotto dal silenziamento della PLCβ1 sia dovuto, in parte, alla modulazione di regolatori epigenetici da parte della PLCβ1. In particolare, l'insieme di questi dati sperimentali ha suggerito non solo l'esistenza di un possibile meccanismo comune tra le due demetilasi e la fosfolipasi C β1, ma addirittura la presenza di una interazione, diretta o indiretta all'interno di uno stesso complesso. Per questo motivo sono stati condotti due esperimenti paralleli: uno studio di Co-Immunoprecipitazione ed esperimenti di analisi dell'espressione genica mediante microarray.

STUDIO DELL'INTERAZIONE TRA PLCB1 e KDM4A o KDM4C

SAGGIO DI CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE (Co-IP)

Per studiare la presenza di una potenziale interazione, diretta o indiretta, mediante formazione di un complesso tra la PLCβ1 e KDM4A o KDM4C all'interno della LAM è stato condotto un saggio di Co-Immunoprecipitazione nelle THP-1.

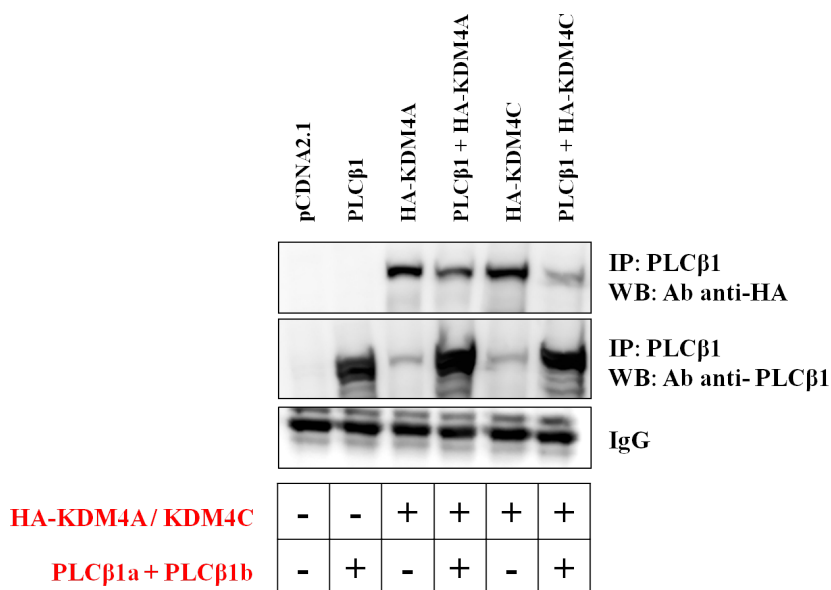


Fig.29 Saggio di Co-IP condotto sulla linea THP-1: entrambe le isoforme per la PLCβ1 (PLCβ1a e 1b), KDM4A (taggato HA), KDM4C (taggato HA) sono stati iperespressi in singolo o in combinazione tra di loro (PLCβ1a+PLCβ1b+KDM4A e PLCβ1a+PLCβ1b+KDM4C) nelle THP-1. Come controllo è stato utilizzato un vettore pCDNA2.1. Le THP-1 sono state lisate a 48 ore dalla trasfezione, il lisato proteico totale è stato immunoprecipitato con una mix di Ab anti-PLCβ1 e l'espressione della PLCβ1, KDM4A e KDM4C è stata studiata.

L'immagine (figura 29) conferma quanto è stato ipotizzato, ossia che KDM4A o KDM4C interagiscono con la PLC β 1 mediante la formazione di un complesso proteico. Come si può osservare dalla figura 29, quando KDM4A o KDM4C vengono iperespressi insieme alla PLC β 1 nelle THP-1 i due enzimi complessano e immunoprecipitano assieme.

MICROARRAY

Allo stesso tempo è stato condotto uno studio di analisi del profilo di espressione genica nelle THP-1 silenziate o per la PLC β 1 o per KDM4A o KDM4C, mediante microarray. Lo scopo è stato quello di comprovare insieme al Co-IP la potenziale interazione tra la PLC β 1 e KDM4 andando a ricercare nuovi potenziali geni la cui espressione venga modulata da entrambi gli enzimi.

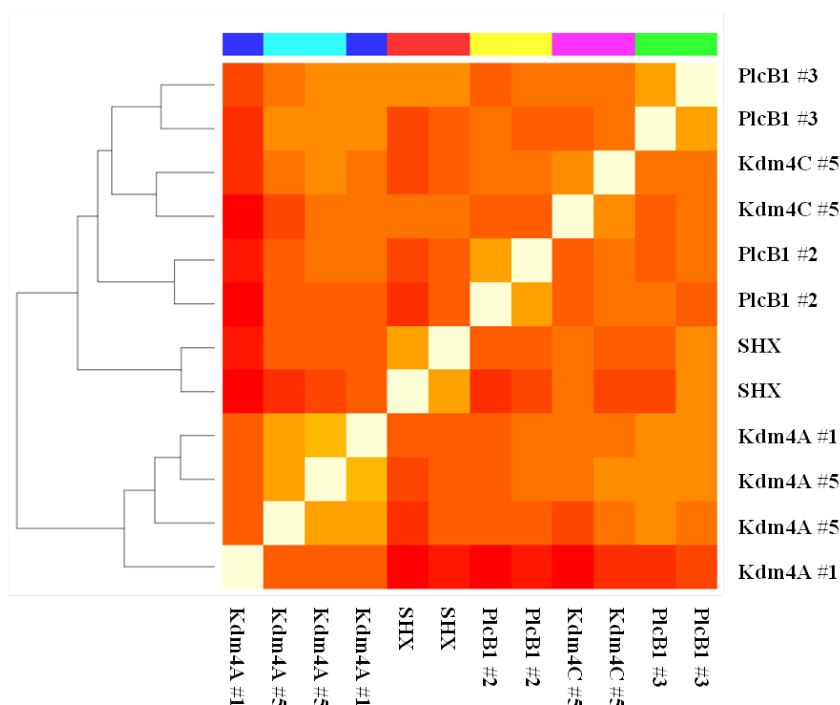


Fig.30 Grafico di correlazione ottenuto dalla normalizzazione quantile dei dati degli array. Metodo di correlazione: pearson. Metodo cluster: ward: le THP-1 sono state silenziate o per PLC β 1 o per KDM4A o KDM4C. Trascorsi 7 giorni dalla trasfezione, l'RNA totale è stato estratto dalle cellule silenziate, convertito a cDNA e contemporaneamente marcato con una sonda fluorescente (biotina). Infine è stato processato per l'analisi per microarray.

Ciò che è straordinariamente emerso è la presenza di un profilo di espressione genica comune tra KDM4 e la PLC β 1, che non di meno è estremamente simile ai profili di espressione ottenuti, tramite gene array, quando HOXA9 è silenziata (GESAs, Gene Set Enrichment Analysis).

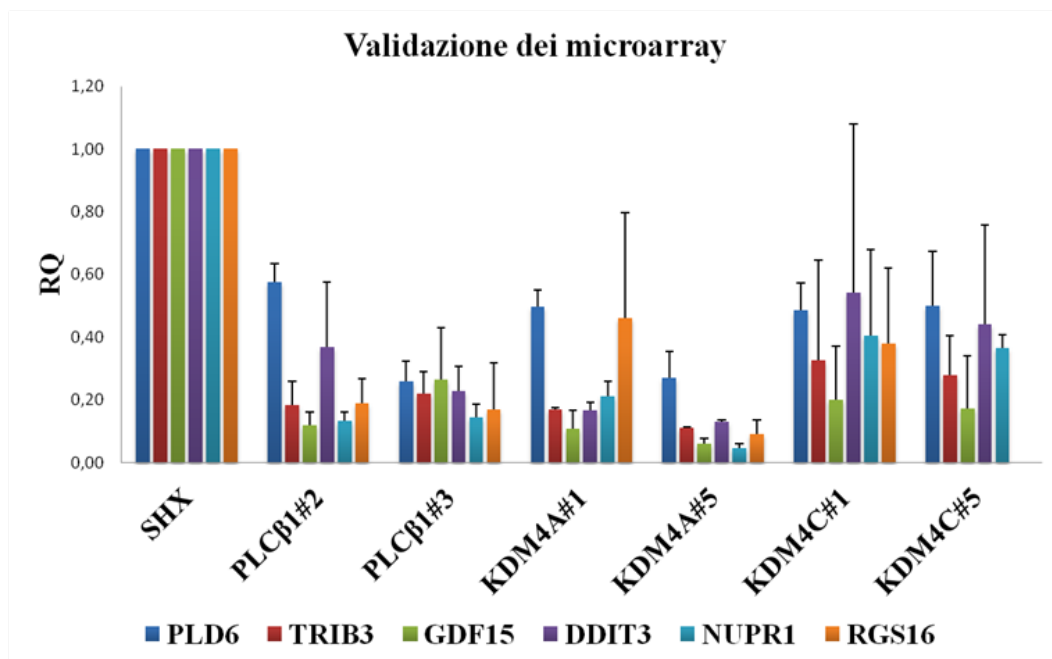
L'analisi di questi dati ha permesso di identificare, su 500 geni, almeno 44 che risultano essere iporegolati o iperregolati sia che fosse silenziata la PLC β 1, sia che fosse silenziato KDM4A o KDM4C nelle THP-1 (dati non mostrati).

Questi risultati dimostrano quindi che non solo la PLC β 1 e KDM4A / 4C interagiscono tra di loro, ma anche l'effettiva esistenza di una via di segnalazione comune tra i due enzimi che coinvolge l'attività di numerosi geni. Tra questi ne sono stati selezionati sei che risultano essere iporegolati: PLD6, GDF15, NUPR1, TRIB3, DDIT3, RGS16 e una deidrogenasi/reduccasi DHRS9 iperregolata quando è silenziata o la PLC β 1 o KDM4A/C. L'intento è stato quello di andare a valutare se la modulazione dell'espressione di questi geni fosse correlata con il fenotipo ottenuto silenziando la PLC β 1 o KDM4A/C, ossia se fossero coinvolti nel parziale blocco proliferativo indotto dalla mancanza di uno dei due enzimi e quindi nella patogenesi della LAM.

VALIDAZIONE DEI MICROARRAY

Inizialmente il risultato ottenuto dall'analisi dei microarray è stato validato mediante Real Time PCR.

A



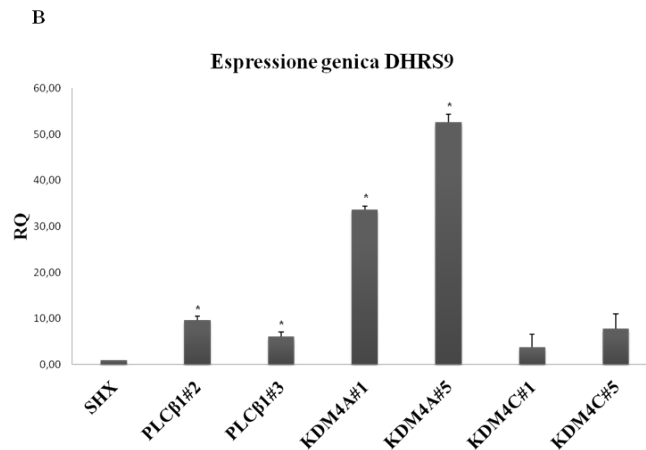
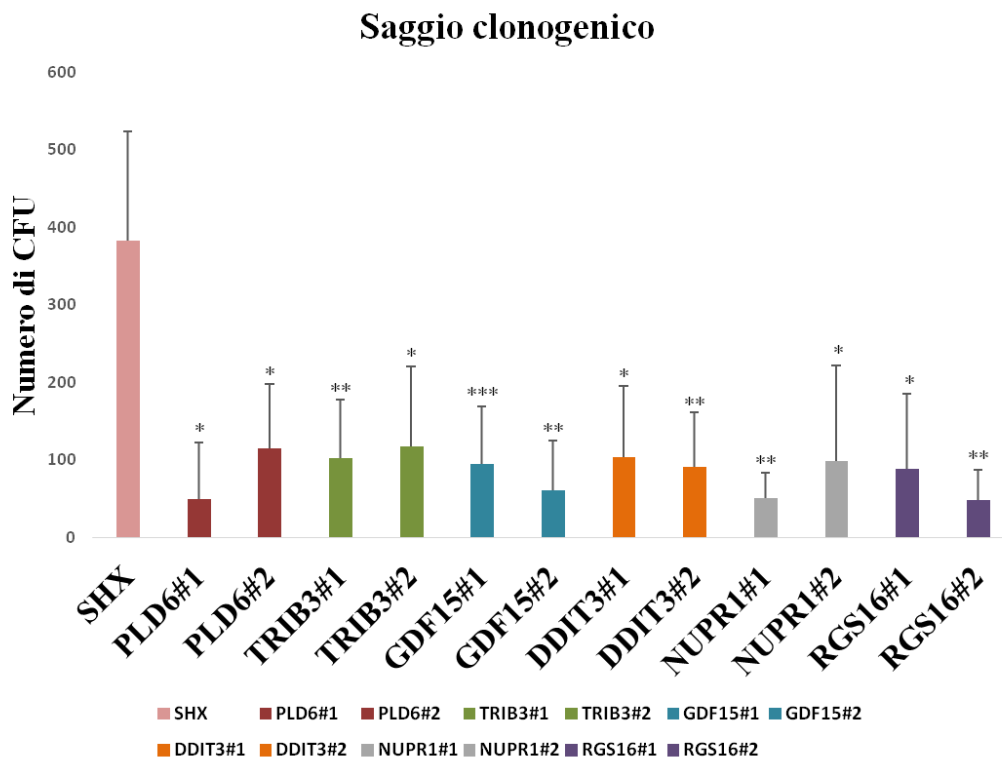
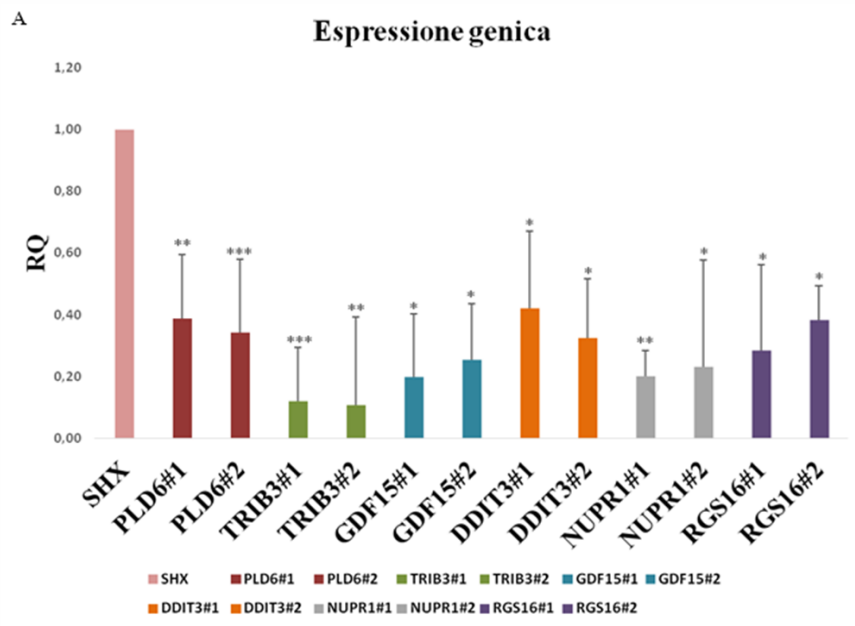


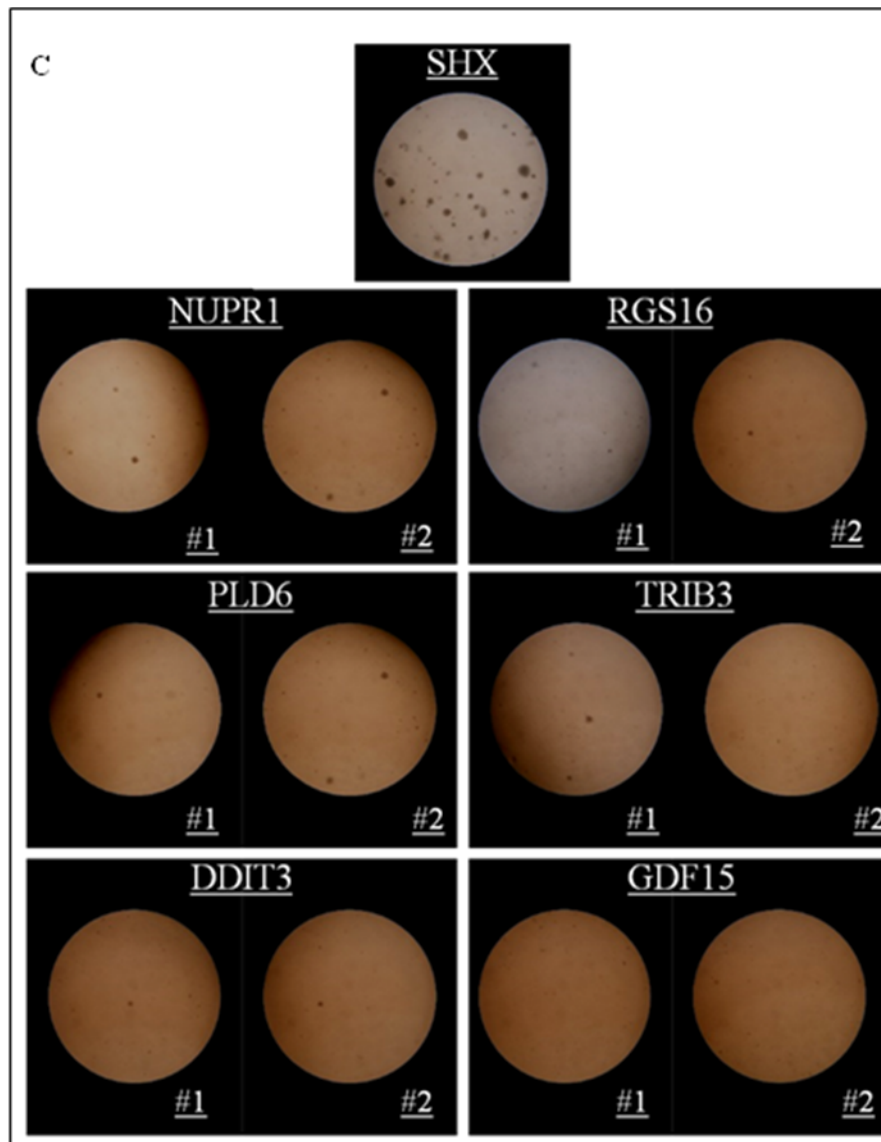
Fig.31A, 31B Real Time PCR condotta sulla linea THP-1 dopo 7 giorni dal silenziamento di KDM4A, KDM4C o PLCβ1: le THP-1 sono state silenziate per la PLCβ1 (#2 e #3) o per KDM4A (#1 e #5) o per KDM4C (#1 e #5). Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. L'espressione dei geni PLD6, GDF15, NUPR1, TRIB3, DDIT3, RGS16 e DHRS9 è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 a 7 giorni dalla trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GAPDH.

Entrambi i grafici (figura 31A e 31B) mostrano chiaramente come il dato ottenuto dai microarray sia riconfermato anche in Real Time PCR. Per tutti i sei geni che da analisi dei microarray risultavano essere iporegolati in seguito al silenziamento della PLCβ1 o di KDM4A si osserva un calo significativo della loro espressione nelle THP-1 silenziate, rispetto al controllo. Un andamento opposto, ma conforme a quanto ottenuto con i microarray, si ottiene invece per DHRS9, che appare iperregolato, rispetto a SHX, in tutti e quattro i casi studiati.

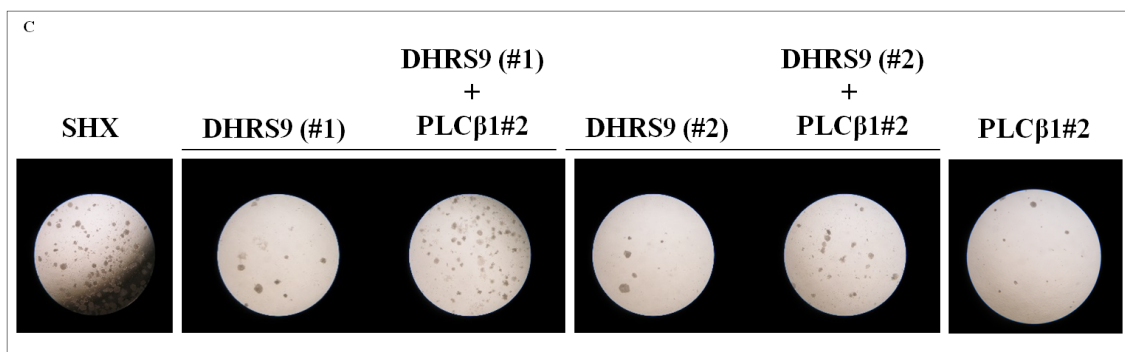
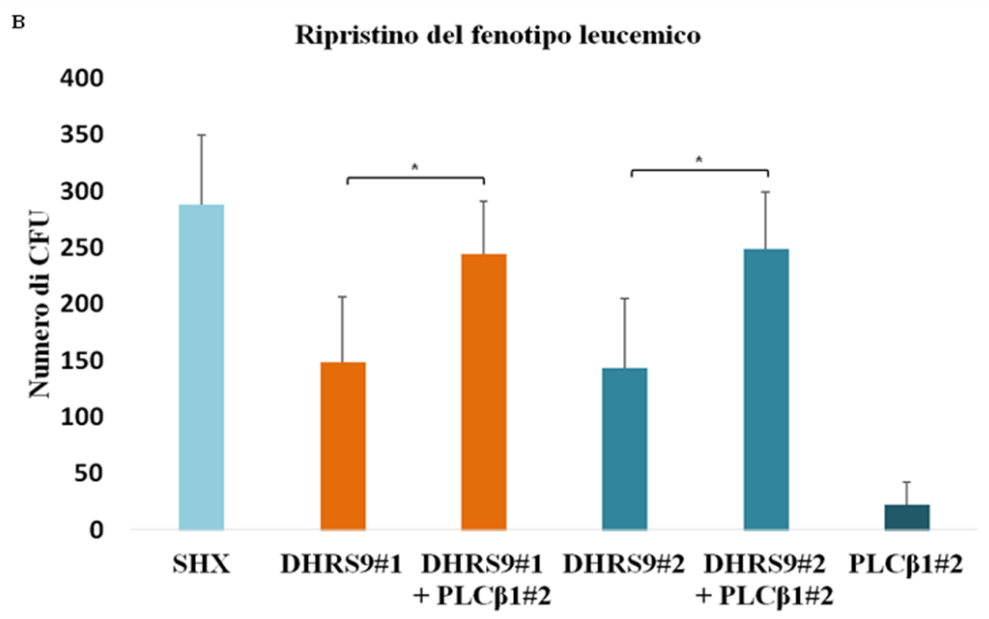
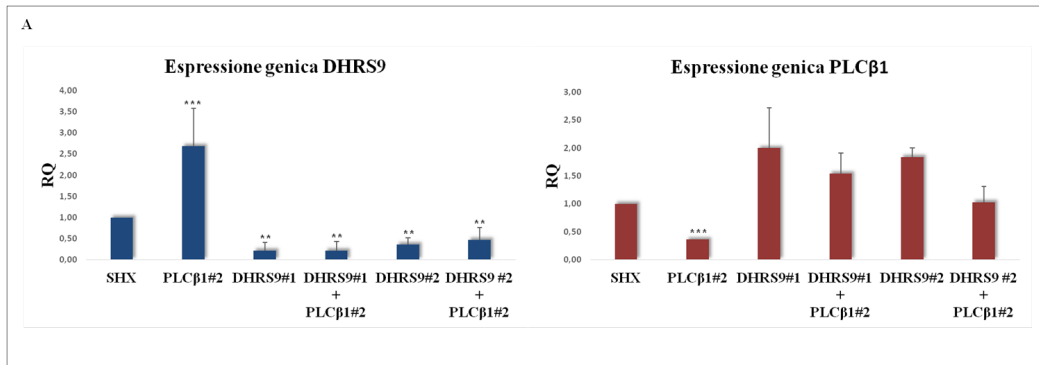
SILENZIAMENTO DEI GENI TARGET

L'obiettivo successivo è stato quello di valutare se il silenziamento di questi nuovi bersagli, potesse dare un fenotipo simile a quello ottenuto silenziando o la PLCβ1 o KDM4A al fine di dimostrare quindi un loro possibile coinvolgimento nei meccanismi della patogenesi della LAM mediata dalla PLCβ1. Per studiare quale fosse l'effetto del silenziamento dei geni PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1, RGS16 e DHRS9, sulla sopravvivenza delle cellule leucemiche, quest'ultimi sono stati silenziate nelle THP-1 mediante trasduzione lentivirale. Il silenziamento è stato controllato tramite Real Time PCR. I suoi effetti sulla capacità di crescita cellulare, nella LAM, sono stati valutati mediante saggio clonogenico e ripristino del fenotipo leucemico nelle THP1 silenziate.





Le THP-1 sono state silenziate per PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1 e RGS16 (#1 o #2). Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. **Fig.32A Real Time PCR** condotta sulla linea THP-1 dopo 48 ore dal silenziamento di PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1, RGS16: l'espressione di ciascun gene è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 a 48 ore dalla trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GAPDH. **Fig.32B e 32C Saggio clonogenico** condotto sulla linea THP-1 silenziate per di PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1 e RGS16 dopo 7 giorni dalla semina in methocult: le THP1 sono state seminate in methocult a 48 ore dalla trasfezione. Le cellule sono state incubate a 37°C, 5% CO₂. Trascorsi 7 giorni dalla semina il numero di colonie (CFU - unità formanti colonia) è stato contato al microscopio ottico.



Le THP-1 sono state silenziate per DHRS9 (#1 e #2) e per la PLCβ1 (#2). Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. **Fig.33A Real Time PCR condotta sulla linea THP-1 dopo 48 ore dal silenziamento della PLCβ1 insieme a DHRS9:** l'espressione di ciascun gene è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dall'mRNA estratto dalle THP-1 a 48 ore dalla trasfezione. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso in ogni reazione un controllo interno standard, ossia la GADPH. **Fig.33B e 33C Saggio clonogenico condotto sulla linea THP-1 silenziata per la PLCβ1 insieme a DHRS9 dopo 7 giorni dalla semina in methocult:** le THP-1

sono state seminate in methocult a 48 ore dalla trasfezione. Le cellule sono state incubate a 37°C, 5% CO₂. Trascorsi 7 giorni dalla semina il numero di colonie (CFU - unità formanti colonia) è stato contato al microscopio ottico.

Quando PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1 e RGS16 sono silenziati correttamente nelle THP-1 (figura 32A), le cellule perdono quasi completamente la capacità di formare colonie (figura 32B e 32C). Il numero di unità formanti colonia si riduce rispetto al controllo di oltre ¼ in tutti i geni studiati e silenziati sia per l' #1 che per l' #2. Si passa, per esempio, da 383 CFU per SHX a 95 CFU (**P≤0,001) per il gene GDF15#1 o a 48 CFU per il gene RGS16#2 (**P≤0,01).

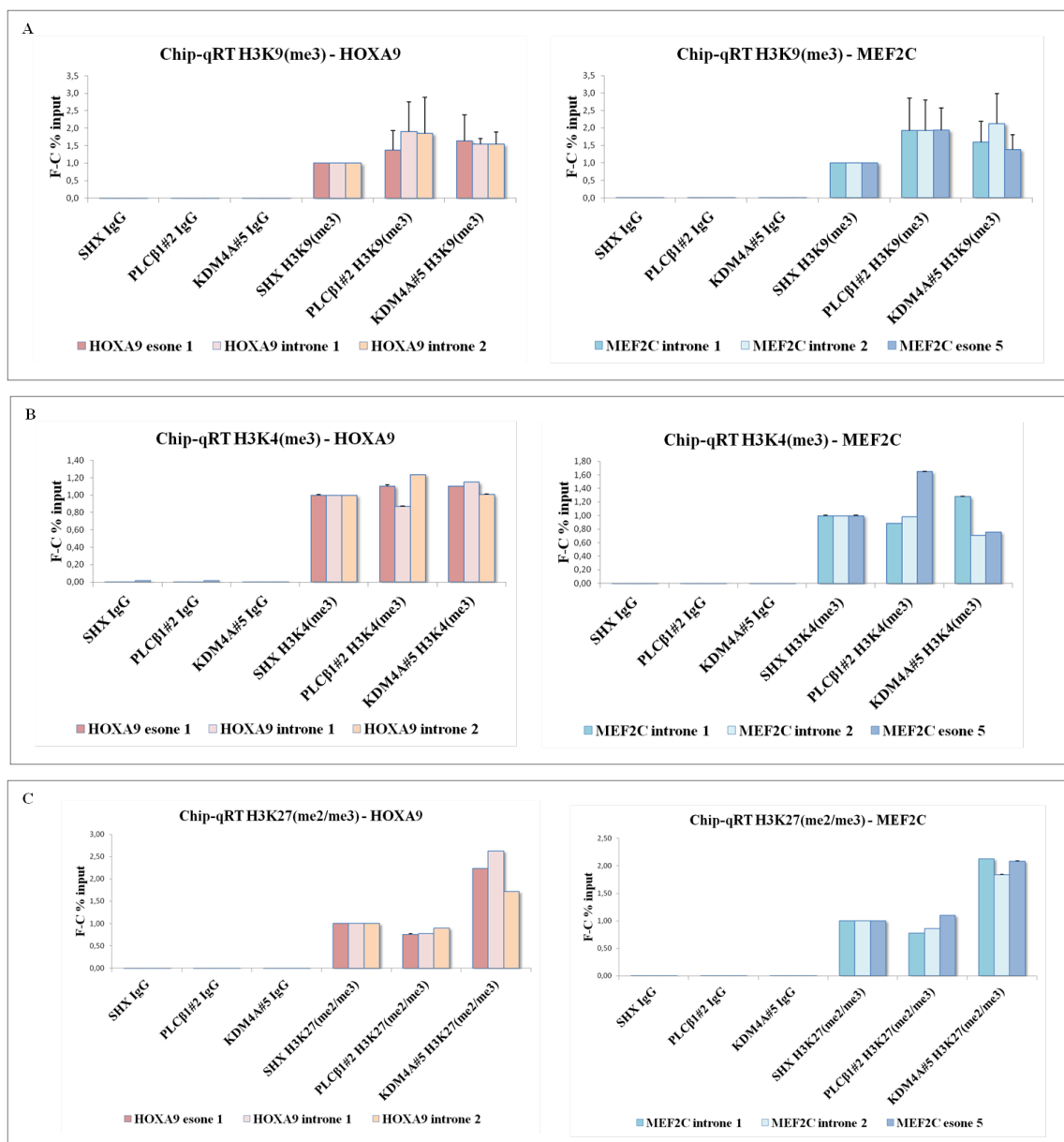
Per quanto riguarda invece DHRS9, da letteratura svolge una importante funzione antitumorale, ha un ruolo anche nella repressione della trascrizione genica e risulta essere spesso espressa in modo aberrante in diversi tumori. La figura 33B mostra che, quando le THP-1 sono opportunamente silenziate sia per la PLCβ1 che per DHRS9 (figura 33A), si ottiene un parziale ma significativo ripristino della capacità di formare colonie da parte delle cellule neoplastiche. Le THP-1 riacquisiscono parte del loro fenotipo tumorale, rispetto ai controlli.

Questi risultati mostrano chiaramente che, la mancata espressione di uno questi geni (PLD6, TRIB3, GDF15, DDIT3, NUPR1, RGS16) porta alla comparsa di un fenotipo estremamente simile a quello ottenuto con il silenziamento della PLCβ1 o di KDM4A, ossia di inibizione della crescita tumorale. Mentre, quando viene a mancare l'espressione di DHRS9, il blocco proliferativo ottenuto silenziando la PLCβ1 o KDM4A viene perso. Pertanto, l'insieme di queste evidenze sperimentali, indicano che in condizioni normali o patologiche, l'espressione di questi geni è sotto uno stretto controllo positivo o negativo (DHRS9) da parte di entrambi gli enzimi. Dimostrando che la regolazione di questi geni da parte sia della PLCβ1 che di KDM4A, partecipa ad un più ampio sistema di controllo della proliferazione neoplastica all'interno della LAM.

IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA

Il passaggio successivo è stato quello di focalizzarsi maggiormente, su quale fosse l'effettivo meccanismo epigenetico alla base della regolazione della trascrizione dei geni HOXA e MEF2C studiati, da parte della PLCβ1 e di come questo enzima possa influenzare lo stato di metilazione di H3K_{9me3}. Nello specifico, sono stati studiati i fenomeni di metilazione e/o demetilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 e su altre lisine a livello del promotore dei geni HOXA9 e MEF2C, tramite i quali la PLCB1 può potenzialmente controllare l'espressione di questi geni coinvolti nella proliferazione incontrollata dei blasti leucemici nella LAM. E' stato pertanto indagato lo stato della metilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 (H3K_{9me3}), sulla lisina 4 (H3K_{4me3}) e sulla

lisina 27 (H3K27_{me2/me3}), così come la presenza della stessa proteina KDM4A, sul promotore dei geni HOXA9 e MEF2C, nelle THP-1 silenziate per la PLCβ1 o per KDM4A. Lo studio è stato condotto tramite esperimenti di *Chromatin Immunoprecipitation*, inizialmente Chip-qRT che ha permesso di raccogliere dati preliminari, e solo successivamente Chip-seq che permetterà di sequenziare e mappare sull'intero genoma i frammenti di DNA immunoprecipitati. Lo scopo è quello di approfondire maggiormente la relazione tra la PLCβ1 e KDM4A, identificare nuove vie di segnalazione e geni bersaglio che sono importanti per la crescita leucemica, ottenere ulteriori informazioni di come la PLCβ1 possa regolare KDM4A per arrivare a capire più nello specifico, come la PLCβ1 regoli la regolazione epigenetica mediata da KDM4A ed identificare nuove vie di segnalazione che agiscono come elementi a valle del segnale della PLCβ1.



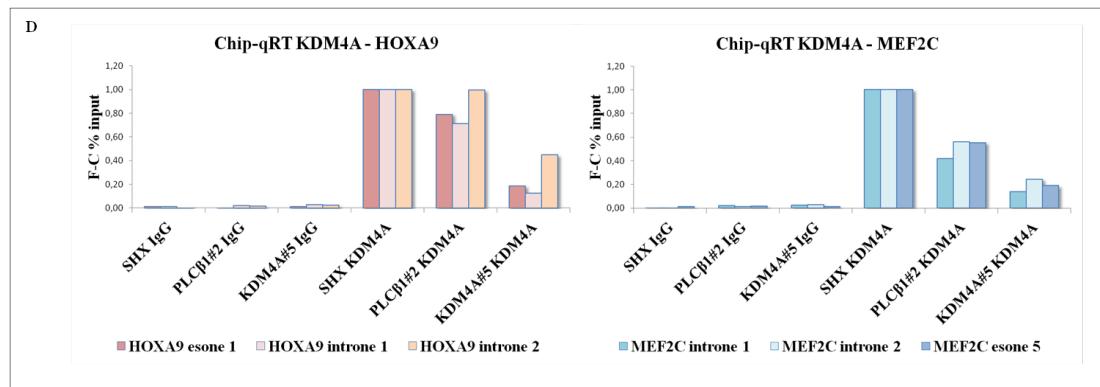


Fig.34A, 34B, 34C, 34D Real Time PCR delle THP-1 silenziate per PLCβ1 o per KDM4A e processate per la X-Chip a 5 giorni dalla trasfezione: la PLCβ1 è stata silenziata nelle THP-1 utilizzando l'#2, mentre KDM4A è stata silenziata utilizzando l'#5. Come controllo è stato utilizzato il vettore SHX. Le THP-1 sono state trattate con formaldeide per fissare l'antigene al suo sito di legame sulla cromatina. Successivamente la cromatina è stata frammentata mediante sonicazione e il DNA è stato immunoprecipitato con l'Ab specifico o per H3K9_{me3}, H3K4_{me3}, o H3K27_{me2/me3} e l'Ab specifico per KDM4A. L'espressione e la quantificazione di HOXA9 e MEF2C è stata controllata attraverso Real Time PCR a partire dai frammenti immunoprecipitati. Per la normalizzazione dei dati è stato incluso anche l'input.

In figura (figura 34A, 34B, 34C, 34D) sono rappresentati i dati preliminari finora ottenuti. Nel loro insieme questi dati mostrano come il silenziamento della PLCβ1 influenzi l'assetto epigenetico dei geni HOXA, modulando lo stato di metilazione a livello del loro promotore. Il grafico 34A, mostra per esempio che quando la PLCβ1 è silenziata, vi è un arricchimento della metilazione dell'H3K9 (H3K9_{me3}) a livello del promotore sia dei geni HOXA9 e MEF2C rispetto al controllo SHX. Poiché la metilazione è segnale di inibizione della trascrizione genica, questo spiegherebbe in parte, come il silenziamento della PLCβ1 è capace di indurre repressione dell'espressione dei geni HOXA e MEF2C. Allo stesso tempo, quando la PLCβ1 è silenziata, viene a ridursi anche la presenza della demetilasi KDM4A sul promotore dei geni HOXA9 e MEF2C (figura 34D). Questo non solo riconfermerebbe l'esistenza di una associazione diretta tra l'attività della PLCβ1 e di KDM4A, ma andrebbe a dare un'ulteriore informazione su come la fosfolipasi C β1 influenzi l'espressione genica, ossia andando potenzialmente a modulare l'attività demetilasi di KDM4A. Si tratta ancora di dati preliminari, ma complessivamente questi risultati dimostrerebbero un meccanismo di controllo da parte dei fosfoinositidi innovativo, andando ulteriormente a confermare il coinvolgimento della PLCβ1 e anche di KDM4A nella regolazione dei geni HOXA per la patogenesi della LAM.

DISCUSSIONE

La ricerca di nuove terapie per la Leucemia Mieloide Acuta, in particolare di terapie mirate che permettano di colpire l'inaccessibile compartimento staminale leucemico, è sempre più necessaria. Questo perché il principale problema legato alla LAM, che ancora non trova una soluzione, è il fatto che i trattamenti attuali convenzionali, non riescono ad eradicare completamente la totalità dei blasti leucemici nella totalità dei pazienti. In particolare, permane quel ristretto *pool* di cellule staminali leucemiche responsabile della malattia, che localizzandosi nella *nicchia midollare*, un compartimento relativamente protetto dagli agenti citotossici, è capace di ripopolare il clone leucemico. Pertanto, una buona percentuale di malati non è responsivo ai trattamenti, presenta un basso grado di remissione o va in contro a ricaduta. A questo problema si aggiungono altre due questioni, fonti sempre di insuccesso terapeutico. La prima è l'insorgenza di farmaco resistenza nei pazienti che sono andati in contro a ricaduta, dovuta ad un ampio spettro di meccanismi che le cellule leucemiche mettono in atto per sopravvivere al danno citotossico e la seconda è la necessità di somministrazione di alte dosi dei farmaci chemioterapici. Queste dosi, se da un lato mostrano una migliore efficacia nel ridurre gli eventi di ricaduta, sono anche causa di seri effetti collaterali, inclusa tossicità fatale nei pazienti. Non solo, il meccanismo pro-apoptotico dei chemioterapici non è limitato alle sole cellule neoplastiche, ma si estende a tutte le cellule attivamente proliferanti, comprese le cellule emopoietiche normali.¹¹

In letteratura è ormai stabilito che alla base di molti tumori vi è una disregolazione dell'assetto epigenetico. In particolare si tratta di fenomeni di ipermetilazione e / o deacetilazione degli istoni a livello dei promotori dei geni.¹¹⁷ Pertanto, lo studio della combinazione di più terapie epigenetiche mirate, che abbiano come bersaglio gli enzimi responsabili di queste modificazione epigenetiche (DNA metiltrasferasi, istone metiltrasferasi, istone deacetilasi) è diventato un'area di grande interesse per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali.¹¹¹ Attualmente diversi farmaci epigenetici sono stati approvati per il trattamento del cancro, e diversi studi hanno già dimostrato come questo tipo di approccio combinato permetta di ottenere un effetto antineoplastico sinergico all'interno della cellula tumorale.⁶³ Anche nel caso della LAM una significativa proporzione di pazienti sviluppa mutazioni a livello dei regolatori epigenetici, spesso associate a metilazione aberrante del DNA, con conseguente alterazione della proliferazione cellulare, resistenza alla chemioterapia e basso tasso di sopravvivenza dei pazienti. Al momento sono in fase di sviluppo diverse strategie terapeutiche che prevedono l'utilizzo di differenti combinazioni di farmaci epigenetici per il trattamento della leucemia. Purtroppo, la strada da percorrere è ancora lunga. L'efficacia di queste terapie è ostacolata da

diversi eventi, come per esempio l'eterogenicità cellulare, la resistenza farmacologica e soprattutto il fatto che si vadano a colpire funzioni cellulari sempre più complesse e articolate.⁶³ Inoltre, questi farmaci inibitori dei meccanismi epigenetici, spesso portano solo ad un blocco proliferativo e/o a stimolo del differenziamento, per cui è evidente la necessità di combinare più approcci terapeutici per arrivare ad eradicare completamente le cellule neoplastiche. Per questo motivo la comunità scientifica sta studiando l'effetto di una terapia più mirata, che preveda anche la combinazione di più farmaci, che consentano di colpire più meccanismi coinvolti nella patogenesi della leucemia.⁶⁹

Negli ultimi anni ha iniziato a suscitare sempre maggiore interesse il coinvolgimento dei PIP nucleari e degli enzimi che li regolano in molti aspetti dei fenomeni epigenetici (interpretazione del codice degli istoni, rimodellamento della cromatina, trascrizione, maturazione e esportazione dell'RNA).²⁵ Inoltre, gli enzimi che regolano i PIP hanno iniziato a rappresentare una classe emergente di bersagli molecolari come trattamento terapeutico per i tumori.¹²⁷

Sulla base di queste evidenze, unite ai dati pregressi ottenuti dal nostro laboratorio, è nato il mio progetto di tesi, che ha voluto focalizzarsi, *in vitro*, sul potenziale utilizzo della PLC β 1 come bersaglio terapeutico per il trattamento della LAM, da solo e soprattutto in combinazione con altri fattori epigenetici.

Il silenziamento stabile della PLC β 1 nella linea cellulare di LAM con traslocazione t(9;11) MLL-AF9, THP-1, è capace di indurre una significativa diminuzione della crescita cellulare. Le THP-1 silenziate, perdono parzialmente la loro capacità di formare colonie e il loro potenziale di crescita incontrollata si riduce drasticamente. Non solo, il silenziamento della PLC β 1 è sufficiente ad indurre un importante arresto delle cellule in fase G₀/G₁ del ciclo cellulare con modulazione dell'espressione proteica, nello specifico attivazione, di alcuni fattori (pRbser780, pRbser807/811, p21 e p27) implicati nella sua regolazione negativa. Questo dato è concorde con quanto riportato in letteratura, riguardo l'importante ruolo fisiologico della PLC β 1 nella regolazione del ciclo cellulare, ossia che la PLC β 1 promuove la progressione attraverso la fase G₀/G₁ e la transizione G₂/M.⁴² Quando la PLC β 1 è silenziata, il suo silenziamento impedisce alle cellule tumorali di progredire attraverso il ciclo cellulare, in quanto vi è una attivazione di quei fattori responsabili della sua inibizione. Questo costituisce di per sé un vantaggio terapeutico, considerato che la prevenzione della crescita tumorale e/o l'induzione del differenziamento rappresentano importanti meccanismi antineoplastici. Inoltre, dati precedentemente raccolti nel laboratorio in cui ho svolto la tesi, hanno dimostrato come il silenziamento della PLC β 1 inibisce la crescita neoplastica di cellule di pazienti con LAM, ma non inibisce la crescita delle cellule di

donatori sani, facendo sperare che un futuro trattamento con inibitore della PLC β 1 agisca solo sulle cellule tumorali e non su quelle normali, al contrario dei chemioterapici convenzionali.

Il blocco proliferativo non è l'unico meccanismo antitumorale indotto in seguito al silenziamento della PLC β 1 nelle THP-1. Questo enzima sembra essere coinvolto anche in meccanismi tardivi apoptotici caspasi-dipendenti in quanto il suo silenziamento, porta ad un aumento significativo della percentuale di apoptosi nelle THP-1 in seguito ad attivazione della caspasi 8 e di PARP1. Questo effetto è molto importante, perché se combinato con il blocco proliferativo indotto nelle THP-1, permetterebbe di arrivare ad eradicare completamente il *pool* di cellule neoplastiche.

Ancora più importante è stata la scoperta del coinvolgimento della PLC β 1 nell'espressione di quelli che sono i fattori responsabili della crescita incontrollata dei blasti leucemici nella LAM con traslocazione MLL, ossia i geni HOXA (HOXA9, HOXA7) e MEF2C e di alcuni dei loro geni bersaglio, ossia PUO6F, SNA1 e ELK1. Sorprendentemente, il silenziamento della PLC β 1 induce un calo importante dell'espressione di questo pannello di geni nelle THP-1, che non è transitorio ma si mantiene costante e stabile nel tempo. Pertanto, questo fenomeno non solo spiegherebbe il meccanismo tramite il quale il silenziamento della PLC β 1 produce un arresto della crescita neoplastica, ossia andando ad inibire la trascrizione di quei geni essenziali per la patogenesi della LAM, ma dimostrerebbe anche il potenziale coinvolgimento della fosfolipasi C β 1 in quei meccanismi epigenetici disregolati all'interno della leucemia.

E' indispensabile sottolineare che questi eventi antiproliferativi, ottenuti in seguito al silenziamento della PLC β 1, sono dovuti alla perdita di una funzione di questo enzima e non ad una sua caratteristica strutturale. Quando le THP-1 sono trattate con l'inibitore specifico per la fosfolipasi C, U7312, che inibisce l'attività enzimatica della PLC, ossia impedisce che il PI $_{(4,5)}$ P $_2$ venga idrolizzato in IP3 e che vi sia rilascio di Ca $^{2+}$ dalle riserve intracellulari, gli effetti ottenuti sull'espressione dei geni HOXA e MEF2C sono gli stessi di quelli osservati in seguito al suo silenziamento.

L'alterata espressione dei geni HOXA e di MEF2C nella LAM è indotta da altrettanti alterati fenomeni di metilazione o acetilazione delle code degli istoni, a livello del promotore di questi geni, da parte di un ampio profilo di enzimi coinvolti nei meccanismi di controllo epigenetico.⁶⁹ Basandoci su questa evidenza scientifica abbiamo controllato se le istone metilasi fossero coinvolte nella diminuzione della crescita cellulare dovuta al silenziamento della PLC β 1. Usando una libreria di *shRNA* per le diverse istone metilasi, abbiamo visto che il silenziamento della metilasi SUV39 insieme al silenziamento della PLC β 1, nelle cellule neoplastiche, porta a un ripristino della capacità proliferativa di quest'ultime. SUV39, è una metiltrasferasi responsabile in condizioni normali del silenziamento dei geni HOXA, in quanto metila l'istone

H3K9 a livello del loro promotore.¹⁰⁹ Tale risultato ha suggerito la presenza di una potenziale interconnessione tra la PLCβ1 e SUV39 per quanto riguarda l'espressione dei geni HOXA. Questo dimostrerebbe un' influenza da parte della PLCβ1 negli eventi di metilazione di H3K9, e che il controllo dell'espressione dei geni HOXA da parte di questo enzima è potenzialmente dovuto ad un suo coinvolgimento diretto o indiretto in questi meccanismi epigenetici di modulazione dello stato della cromatina. Nello specifico la PLCβ1 sembra essere coinvolta nei processi di controllo della metilazione dell'istone H3K9, probabilmente antagonizzando il silenziamento genico indotto dalla metilazione da parte di SUV39. Per cui, la ridotta espressione dei geni HOXA osservata in assenza della PLCβ1, potrebbe essere dovuta ad un incremento della metilazione di H3K9 (H3K9_{me3}) sul promotore di questi geni, proprio per la mancanza di questo enzima. A dare maggior forza a questa ipotesi, è stato il fatto che l'attivazione di SIRT1 nelle THP-1 sembra avere un effetto sinergico con il silenziamento della PLCβ1 nell'incrementare il blocco proliferativo indotto dalla sola fosfolipasi. SIRT1 è una deacetilasi dell'H3K9 che collabora con SUV39 per indurre repressione della trascrizione dei geni HOXA.¹⁰⁶ Quando la PLCβ1 è silenziata, e allo stesso tempo SIRT1 viene attivato, la capacità clonogenica delle THP-1 si riduce drasticamente. Questo meccanismo antineoplastico combinato, potrebbe essere ricollegato al fatto che l'assenza della PLCβ1 favorisce la metilazione dell'istone H3K9, a cui si va ad aggiungere l'attività deacetilasica di SIRT1, che promuoverebbe ulteriormente il silenziamento della trascrizione dei geni HOXA. La combinazione di questi trattamenti potrebbe coadiuvare in un nuovo trattamento della LAM.

A questo punto, l'attenzione è stata focalizzata su altri due enzimi che controllano la metilazione di H3K9 insieme a SUV39 e SIRT1, ossia le istone demetilasi KDM4A e KDM4C. All'interno della patogenesi della LAM, questi enzimi sono responsabili di proliferazione neoplastica, in quanto rimuovendo i gruppi metili dal promotore dei geni HOXA, ne favoriscono la trascrizione genica.⁶⁹ Quando KDM4A o KDM4C sono silenziati nelle THP-1, la capacità di crescita delle cellule si riduce significativamente e le cellule, mostrano un fenotipo estremamente simile a quello ottenuto silenziando la PLCβ1. Il numero di colonie che le THP-1 silenziate sono in grado di formare diminuisce notevolmente e allo stesso tempo, l'espressione dei geni HOXA (HOXA9, HOXA7) e MEF2C risulta essere iporegolata in modo importante. Non solo, questo calo di espressione è sorprendentemente paragonabile a quello indotto dal silenziamento della PLCβ1 nelle THP-1. Questi risultati hanno fatto ipotizzare la presenza di una relazione funzionale o di un meccanismo comune tra la PLCβ1 e KDM4A o KDM4C, ossia che la PLCβ1 possa, direttamente o indirettamente interagire con KDM4A o KDM4C, e modularne la sua attività demetilasica. Ciò che è emerso e che ha confermato le nostre ipotesi è che, non solo questi due enzimi interagiscono direttamente tra di loro mediante la formazione di

un complesso proteico, ma presentano anche un profilo di espressione genica comune identificato mediante esperimenti di microarray, che non di meno è estremamente simile ai profili di espressione ottenuti, tramite gene array, quando HOXA9 è silenziata (GESA, *Gene Set Enrichment Analysis*)¹²⁸. Infatti sono stati identificati 44 differenti geni che risultano essere modulati quando la PLCβ1 o KDM4A/4C sono silenziati nelle THP-1, dimostrando l'esistenza di possibili vie di segnalazione comuni tra i due enzimi, che coinvolge l'attività di numerosi geni. Tra questi, PLD6, GDF15, NUPR1, TRIB3, DDIT3, RGS16, la cui espressione è risultata essere iporegolata, quando PLCβ1 o KDM4 sono silenziati nelle THP-1 producono un fenotipo di crescita neoplastica estremamente simile a quello ottenuto con il silenziamento della PLCβ1 o di KDM4.

PLD6 esprime per la fosfolipasi D, che si localizza sulla membrana esterna dei mitocondri. Questo gene è coinvolto nei meccanismi di segnalazione cellulare in quanto la sua attivazione determina l'idrolisi della fosfatidilcolina in colina e acido fosfatidico, che funge da secondo messaggero. Recentemente, PLD6 è stato identificato come mediatore dell'attività del protooncogene MYC nel carcinoma mammario.¹²⁹

GDF15 (*Growth Differentiation Factor*) è una citochina coinvolta nel differenziamento, nella risposta adattativa allo stress, nell'infiammazione e nello sviluppo di organi e tessuti. Questo gene viene attivato durante il differenziamento della linea eritroide e fa parte del sistema di regolazione associato ai geni HOX. GDF15 risulta essere disregolato in molti tumori. Condizioni di ipossia all'interno del microambiente tumorale, possono portare all'attivazione di KDM3A che è responsabile di demetilazione del promotore di un gruppo di geni di cui GDF15 fa parte e che porta ad un aumento della loro espressione.¹³⁰

NUPR1: (*Nuclear Protein 1*) è un gene associato alla famiglia proteica delle *HMG-I/Y like*, ed esplica le proprie funzioni legandosi al DNA o a proteine coinvolte nella regolazione della trascrizione. Diversi stimoli di stress inducono l'attivazione di NUPR1, che a sua volta modifica il profilo di espressione genica della cellula e le permette di rispondere ai cambiamenti del microambiente in cui si trova. La proteina presenta, al C-terminale, una sequenza NLS per la traslocazione nel nucleo, dove NUPR1 può svolgere la sua funzione di regolatore della trascrizione. La sua attività è regolata dalla fosforilazione da parte della PKA.¹³¹ L'aumento di espressione di NUPR1 è associato a svariate neoplasie, dove sembra essere coinvolto nella proliferazione tumorale, in quanto è dimostrato che questo gene sostiene la progressione tumorale e lo sviluppo di metastasi.¹³² Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato un effetto opposto per NUPR1, ossia un'azione antitumorale, promuovendo l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi e l'autofagia, probabilmente perché il suo effetto è fortemente influenzato dal contesto in cui si trova e dal fatto che questo gene influenza diverse vie cellulari.¹³³

TRIB3 codifica per le proteine Tribbles. E' coinvolto sia in malattie metaboliche che nel cancro. Interessante è il fatto che il suo omologo TRIB1 è implicato nella patogenesi della LAM, in quanto interagisce direttamente con il gene HOXA, HOXA9.¹³⁴

DDIT3: (*DNA Damage Inducible Transcript 3*) codifica per la proteina CHOP (*C/EBP homologous protein*) che è coinvolta nelle vie di segnalazione attivate in risposta allo stress, con conseguente blocco del ciclo cellulare e induzione del processo apoptotico.¹³⁵ Non solo, diversi esperimenti hanno dimostrato che DDIT3 è capace di promuovere la trascrizione di diversi geni, fra cui lo stesso TRIB3. Numerosi studi testimoniano il suo coinvolgimento anche in altre funzioni cellulari, come l'adipogenesi e l'eritrogenesi e nel controllo del metabolismo.¹³⁶

RGS16: il gene RGS16 (*Regulator of G protein Signaling 16*) esprime per una proteina appartenente alla famiglia delle RGS. RGS16 è coinvolta nella regolazione dell'omeostasi cellulare attraverso le vie di segnalazione attivate dalle proteine G eterotrimeriche, in quanto interagisce con la subunità alfa delle proteine G e ne attiva l'attività GTPasica con conseguente spegnimento della via di trasduzione.¹³⁷ RGS16 è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare, dove a seconda del tipo cellulare è capace di inibire o promuovere la proliferazione.¹³⁸ Per esempio, nel tumore al seno, RGS16 è in grado di inibire la proliferazione neoplastica, mentre esercita un effetto opposto sulle cellule β degli isolotti pancreatici, inducendole a secernere insulina.^{139 140}

Il loro silenziamento porta ad una riduzione della sopravvivenza delle cellule neoplastiche, in quanto il numero di colonie diminuisce drasticamente.

Allo stesso modo, anche il gene DHRS9, che dalle analisi di microarray è apparso essere iperregolato sia in seguito al silenziamento della PLC β 1 che con il silenziamento di KDM4, si è dimostrato essere associato ai fenomeni di proliferazione neoplastica che vedono coinvolta la fosfolipasi C β 1 all'interno della LAM. DHRS9 da letteratura è implicata nella biosintesi dell'acido retinoico e svolge una importante funzione anti-tumorale (tramite l'inibizione della proliferazione, stimolo del differenziamento e apoptosi). Ricopre un ruolo anche nella repressione della trascrizione genica e risulta essere spesso espressa in modo aberrante in diversi tumori.¹⁴¹ Il doppio silenziamento delle THP-1 per la PLC β 1 e DHRS9, porta a un parziale ripristino del fenotipo neoplastico. Le cellule tumorali riacquistano il loro potenziale clonogenico e quindi la loro capacità proliferativa, che viene persa con il solo silenziamento della PLC β 1.

Ciò che emerge da queste evidenze sperimentali è che in condizioni normali o patologiche, l'espressione di questi geni è sotto uno stretto controllo positivo o negativo da parte sia della PLC β 1 che di KDM4A. PLD6, GDF15, NUPR1, TRIB3, DDIT3, RGS16 e DHRS9, partecipano quindi al blocco proliferativo indotto dal silenziamento della PLC β 1 e di conseguenza ai meccanismi di crescita cellulare leucemica che sembrano essere regolati da

questa fosfolipasi. Questi geni rappresentano pertanto, dei nuovi e importanti potenziali bersagli terapeutici per il trattamento della LAM, per una terapia mirata che prevede la combinazione con farmaci inibitori per la PLC β 1.

Infine, studi iniziali condotti mediante Chip-qRT hanno confermato quale sia il potenziale meccanismo epigenetico alla base della regolazione dei geni HOXA da parte della PLC β 1. Il silenziamento della PLC β 1 sembra influenzare l'assetto epigenetico dei geni HOXA, modulando lo stato di metilazione a livello del loro promotore.

Quando la PLC β 1 è silenziata, vi è un arricchimento della metilazione dell'H3K9 (H3K9_{me3}) a livello del promotore dei geni HOXA9 e MEF2C. Poiché questa metilazione è segnale di inibizione della trascrizione genica, la sua iperegolazione spiegherebbe in parte come il silenziamento della PLC β 1 possa essere capace di indurre repressione dell'espressione dei geni HOXA. Allo stesso tempo, sempre quando la PLC β 1 è silenziata, la presenza della demetilasi KDM4A sul promotore dei geni HOXA9 e MEF2C si riduce. Questo non solo riconferma l'esistenza di una relazione tra l'attività della PLC β 1 e di KDM4A, ma aiuta a comprendere come la fosfolipasi C β 1 influenzi l'espressione genica, ossia andando potenzialmente a modulare l'attività demetilasi di KDM4A sui geni HOXA, incrementandola. Si tratta ancora di dati preliminari, ma complessivamente questi risultati dimostrerebbero un meccanismo di controllo da parte dei fosfoinositidi innovativo e confermerebbero il coinvolgimento della PLC β 1 nella regolazione dei geni HOXA e MEF2C all'interno della patogenesi della LAM.

CONCLUSIONI

L'insieme di queste evidenze sperimentali ha permesso di riconfermare ed approfondire quanto già osservato nei dati preliminari. In particolare, i risultati ottenuti dimostrano l'implicazione diretta della PLC β 1 nei meccanismi di crescita neoplastica incontrollata della LAM e che la sua sola inibizione è sufficiente ad arrestare, almeno in parte, questi fenomeni proliferativi. La PLC β 1 agisce su quei fattori coinvolti nei meccanismi di progressione del ciclo cellulare e ancora più importante influenza l'espressione di geni indispensabili per l'insorgenza e il mantenimento della LAM. Ossia la PLC β 1 risulta essere implicata nei meccanismi epigenetici che regolano le modifiche dello stato di attivazione o inibizione della trascrizione dei geni HOXA e di MEF2C. Questo si verifica attraverso la modulazione diretta dell'attività di alcuni enzimi regolatori epigenetici sull'istone H3K9, nello specifico la demetilasi KDM4A. Non solo, la PLC β 1 modula anche l'espressione di un ampio pannello di geni da letteratura spesso associati a proliferazione tumorale, ma mai nella LAM, che rappresentano un importante gruppo di nuovi potenziali bersagli terapeutici per il trattamento della leucemia.

Complessivamente, i dati ottenuti dimostrano una stretta implicazione della PLC β 1 nella patogenesi della LAM. E' quindi interessante andare ad approfondire questa tematica allo scopo di, in un futuro, poter associare un inibitore per la PLC β 1 con nuove combinazioni di fattori epigenetici che possano agire in sinergia per revertire questa trascrizione genica disregolata e quindi inibire la progressione del fenotipo leucemico.

Gli obiettivi futuri sono quelli di approfondire maggiormente la relazione tra la PLC β 1 e KDM4A, identificare nuove vie di segnalazione e geni bersaglio importanti per la crescita leucemica a valle del segnale della PLC β 1 e capire più nello specifico come la PLC β 1 possa influenzare l'attività epigenetica di KDM4A. Attualmente, sono in corso esperimenti *in vitro* di CRISP-CAS9, per lo studio del legame tra PLC β 1 e KDM4A. Lo scopo è quello di mutare il sito di legame per i fosfoinositidi su KDM4A e osservare all'interno della LAM, cosa succede quando questa interazione viene a mancare.

BIBLIOGRAFIA

1. Seke Etet, P. F., Vecchio, L. & Nwabo Kamdje, A. H. Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: Key role of stromal microenvironment. *Cell. Signal.* **24**, 1883–1888 (2012).
2. Sante Tura & Michele Baccarani. 'Corso di Malattie del sangue e degli organi emopoietici'. Società editrice Esculapio.
3. Rossi, L., Salvestrini, V., Ferrari, D., Di Virgilio, F. & Lemoli, R. M. The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood* **120**, 2365–2375 (2012).
4. Calvi, L. M. & Link, D. C. Cellular Complexity of the Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche. *Calcif. Tissue Int.* **94**, 112–124 (2014).
5. Robb, L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* **26**, 6715–6723 (2007).
6. Vardiman, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292–2302 (2002).
7. Lamba, J. K. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* **10**, 1657–1674 (2009).
8. Salvestrini, V. *et al.* Purinergic signaling inhibits human acute myeloblastic leukemia cell proliferation, migration, and engraftment in immunodeficient mice. *Blood* **119**, 217–226 (2012).
9. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
10. Guenechea, G., Gan, O. I., Dorrell, C. & Dick, J. E. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat. Immunol.* **2**, 75–82 (2001).

11. Horton, S. J. & Huntly, B. J. P. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica* **97**, 966–974 (2012).
12. Hope, K. J., Jin, L. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia stem cells. *Arch. Med. Res.* **34**, 507–514 (2003).
13. Tsimberidou, A.-M. *et al.* The role of gemtuzumab ozogamicin in acute leukaemia therapy. *Br. J. Haematol.* **0**, 051220022257010 (2005).
14. Guzman, M. L. & Jordan, C. T. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* **11**, 97–104 (2004).
15. Shattuck, L. J., D’Elia, G. & Folse, J. R. Illinois’ non-urban primary care physicians. *IMJ Ill. Med. J.* **155**, 303–308 (1979).
16. Lin, Y. *et al.* Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin. Med. J. (Engl.)* **119**, 905–910 (2006).
17. Faenza, I., Fiume, R., Piazzini, M., Colantoni, A. & Cocco, L. Nuclear inositide specific phospholipase C signalling - interactions and activity. *FEBS J.* **280**, 6311–6321 (2013).
18. Divecha, N. & Halstead, J. R. Of yeast and men. *EMBO Rep.* **5**, 865–866 (2004).
19. Shah, Z. H. *et al.* Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. *FEBS J.* **280**, 6295–6310 (2013).
20. Lewis, A. E. *et al.* Identification of Nuclear Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-Interacting Proteins by Neomycin Extraction. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.003376 (2011).
21. Irvine, R. F. Nuclear inositide signalling—expansion, structures and clarification. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 505–508 (2006).
22. Martelli, A. M. *et al.* Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) β 1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation. *FEBS Lett.* **486**, 230–236 (2000).

23. Martelli, A. M. *et al.* Nuclear lipids: New functions for old molecules? *J. Cell. Biochem.* **88**, 455–461 (2003).
24. Gozani, O. *et al.* The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**, 99–111 (2003).
25. Stijf-Bultsma, Y. *et al.* The Basal Transcription Complex Component TAF3 Transduces Changes in Nuclear Phosphoinositides into Transcriptional Output. *Mol. Cell* **58**, 453–467 (2015).
26. Rando, O. J., Zhao, K., Janmey, P. & Crabtree, G. R. Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 2824–2829 (2002).
27. Mellman, D. L. *et al.* A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature* **451**, 1013–1017 (2008).
28. Mazzotti, G. *et al.* Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate localization sites within the nucleus. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **43**, 181–191 (1995).
29. Emerling, B. M. *et al.* Depletion of a Putatively Druggable Class of Phosphatidylinositol Kinases Inhibits Growth of p53-Null Tumors. *Cell* **155**, 844–857 (2013).
30. Keune, W.-J. *et al.* Low PIP4K2B Expression in Human Breast Tumors Correlates with Reduced Patient Survival: A Role for PIP4K2B in the Regulation of E-Cadherin Expression. *Cancer Res.* **73**, 6913–6925 (2013).
31. Jude, J. G. *et al.* A targeted knockdown screen of genes coding for phosphoinositide modulators identifies PIP4K2A as required for acute myeloid leukemia cell proliferation and survival. *Oncogene* **34**, 1253–1262 (2015).
32. Gelato, K. A. *et al.* Accessibility of Different Histone H3-Binding Domains of UHRF1 Is Allosterically Regulated by Phosphatidylinositol 5-Phosphate. *Mol. Cell* **54**, 905–919 (2014).

33. Ndamukong, I., Jones, D. R., Lapko, H., Divecha, N. & Avramova, Z. Phosphatidylinositol 5-Phosphate Links Dehydration Stress to the Activity of ARABIDOPSIS TRITHORAX-LIKE Factor ATX1. *PLoS ONE* **5**, e13396 (2010).
34. Park, J. B. *et al.* Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 782–792 (2012).
35. Nuclear phosphoinositide specific phospholipase C (PI-PLC)- β 1: a central intermediary in nuclear lipid-dependent signal transduction. *Histol. Histopathol.* 1251–1260 (2005).
doi:10.14670/HH-20.1251
36. Brugnoli, F., Bavelloni, A., Benedusi, M., Capitani, S. & Bertagnolo, V. PLC- β 2 activity on actin-associated polyphosphoinositides promotes migration of differentiating tumoral myeloid precursors. *Cell. Signal.* **19**, 1701–1712 (2007).
37. Rhee, S. G. Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281–312 (2001).
38. Follo, M., Lo, V. V., Martinelli, G., Giandomenico, P. G. & Cocco, L. PLCB1 (phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* (2011).
doi:10.4267/2042/38314
39. Bahk, Y. Y. *et al.* Two forms of phospholipase C-beta 1 generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **269**, 8240–8245 (1994).
40. Irvine, R. F. Nuclear lipid signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 349–361 (2003).
41. Cocco, L., Manzoli, L., Palka, G. & Martelli, A. M. Nuclear phospholipase C β 1, regulation of the cell cycle and progression of acute myeloid leukemia. *Adv. Enzyme Regul.* **45**, 126–135 (2005).
42. Faenza, I. *et al.* A Role for Nuclear Phospholipase C β 1 in Cell Cycle Control. *J. Biol. Chem.* **275**, 30520–30524 (2000).

43. Cocco, L. *et al.* Physiology and pathology of nuclear phospholipase C β 1. *Adv. Enzyme Regul.* **51**, 2–12 (2011).
44. Bertagnolo, V. *et al.* Phospholipase C- β 2 promotes mitosis and migration of human breast cancer-derived cells. *Carcinogenesis* **28**, 1638–1645 (2007).
45. Bertagnolo, V. *et al.* PLC-beta2 is highly expressed in breast cancer and is associated with a poor outcome: a study on tissue microarrays. *Int. J. Oncol.* **28**, 863–872 (2006).
46. Xiao, W. *et al.* Tumor Suppression by Phospholipase C- β 3 via SHP-1-Mediated Dephosphorylation of Stat5. *Cancer Cell* **16**, 161–171 (2009).
47. Fu, L. *et al.* Characterization of a Novel Tumor-Suppressor Gene PLC 1 at 3p22 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **67**, 10720–10726 (2007).
48. Bertagnolo, V. *et al.* Selective up-regulation of phospholipase C-beta2 during granulocytic differentiation of normal and leukemic hematopoietic progenitors. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 957–965 (2002).
49. Nakamura, Y. Phospholipase C 1 is required for skin stem cell lineage commitment. *EMBO J.* **22**, 2981–2991 (2003).
50. Piccolo, E. *et al.* The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cy1 activity in cell migration. *Oncogene* **21**, 6520–6529 (2002).
51. Katterle, Y. *et al.* Antitumour effects of PLC- γ 1-(SH2)²-TAT fusion proteins on EGFR/c-erbB-2-positive breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **90**, 230–235 (2004).
52. Sala, G. *et al.* Phospholipase C 1 Is Required for Metastasis Development and Progression. *Cancer Res.* **68**, 10187–10196 (2008).
53. Thomas, S. M. *et al.* Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 5629–5635 (2003).

54. Pozzobon, M., Marafioti, T., Hansmann, M.-L., Natkunam, Y. & Mason, D. Y. Intracellular signalling molecules as immunohistochemical markers of normal and neoplastic human leucocytes in routine biopsy samples. *Br. J. Haematol.* **124**, 519–533 (2004).
55. Nomoto, K. *et al.* Expression of phospholipases gamma 1, beta 1, and delta 1 in primary human colon carcinomas and colon carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* **12**, 146–152 (1995).
56. Marchisio, M. *et al.* Phospholipase C delta2 expression characterizes the neoplastic transformation of the human gastric mucosa. *Am. J. Pathol.* **159**, 803–808 (2001).
57. Santi, P. *et al.* Inositol-specific phospholipase C in low and fast proliferating hepatoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **22**, 1147–1153 (2003).
58. Stålberg, P. *et al.* In situ RNA-RNA hybridisation of phospholipase C beta 3 shows lack of expression in neuroendocrine tumours. *Anticancer Res.* **23**, 2227–2232 (2003).
59. Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 823–833 (2007).
60. Henikoff, S. & Shilatifard, A. Histone modification: cause or cog? *Trends Genet.* **27**, 389–396 (2011).
61. Dawson, M. A., Kouzarides, T. & Huntly, B. J. P. Targeting Epigenetic Readers in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **367**, 647–657 (2012).
62. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
63. Cai, S. F., Chen, C.-W. & Armstrong, S. A. Drugging Chromatin in Cancer: Recent Advances and Novel Approaches. *Mol. Cell* **60**, 561–570 (2015).
64. Soini, Y., Kosma, V.-M. & Pirinen, R. KDM4A, KDM4B and KDM4C in non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 12922–12928 (2015).
65. Daigle, S. R. *et al.* Selective Killing of Mixed Lineage Leukemia Cells by a Potent Small-Molecule DOT1L Inhibitor. *Cancer Cell* **20**, 53–65 (2011).

66. Cheung, N. *et al.* Targeting Aberrant Epigenetic Networks Mediated by PRMT1 and KDM4C in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **29**, 32–48 (2016).
67. Chang, P.-C. *et al.* Histone Demethylase JMJD2A Regulates Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Replication and Is Targeted by a Viral Transcriptional Factor. *J. Virol.* **85**, 3283–3293 (2011).
68. Cohen, I., Poreba, E., Kamieniarz, K. & Schneider, R. Histone Modifiers in Cancer: Friends or Foes? *Genes Cancer* **2**, 631–647 (2011).
69. Agger, K. *et al.* Jmjd2/Kdm4 demethylases are required for expression of *Il3ra* and survival of acute myeloid leukemia cells. *Genes Dev.* **30**, 1278–1288 (2016).
70. Eklund, E. A. The role of HOX genes in malignant myeloid disease: *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 85–89 (2007).
71. Ernst, P., Wang, J., Huang, M., Goodman, R. H. & Korsmeyer, S. J. MLL and CREB Bind Cooperatively to the Nuclear Coactivator CREB-Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2249–2258 (2001).
72. Zeleznik-Le, N. J., Harden, A. M. & Rowley, J. D. 11q23 translocations split the 'AT-hook' cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10610–10614 (1994).
73. Nakamura, T. *et al.* ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* **10**, 1119–1128 (2002).
74. Dou, Y. *et al.* Physical Association and Coordinate Function of the H3 K4 Methyltransferase MLL1 and the H4 K16 Acetyltransferase MOF. *Cell* **121**, 873–885 (2005).
75. Yokoyama, A. *et al.* The Menin Tumor Suppressor Protein Is an Essential Oncogenic Cofactor for MLL-Associated Leukemogenesis. *Cell* **123**, 207–218 (2005).

76. Faber, J. *et al.* HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* **113**, 2375–2385 (2009).
77. Richardson, C. & Jasin, M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* **405**, 697–700 (2000).
78. Milne, T. A., Martin, M. E., Brock, H. W., Slany, R. K. & Hess, J. L. Leukemogenic MLL Fusion Proteins Bind across a Broad Region of the *Hox a9* Locus, Promoting Transcription and Multiple Histone Modifications. *Cancer Res.* **65**, 11367–11374 (2005).
79. Meyer, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **20**, 777–784 (2006).
80. Dafflon, C., Tiedt, R. & Schwaller, J. Targeting multiple nodes of MLL complexes to improve leukemia therapy. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.21598
81. Sala. Down-regulation of HOXA4, HOXA7, HOXA10, HOXA11 and MEIS1 during monocyte-macrophage differentiation in THP-1 cells. *Mol. Med. Rep.* (2009). doi:10.3892/mmr_00000090
82. Corral, J. *et al.* An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* **85**, 853–861 (1996).
83. Collins, E. C., Pannell, R., Simpson, E. M., Forster, A. & Rabbitts, T. H. Inter-chromosomal recombination of Mll and Af9 genes mediated by cre-loxP in mouse development. *EMBO Rep.* **1**, 127–132 (2000).
84. Kumar, A. R. Hoxa9 influences the phenotype but not the incidence of Mll-AF9 fusion gene leukemia. *Blood* **103**, 1823–1828 (2004).
85. Krivtsov, A. V. *et al.* Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature* **442**, 818–822 (2006).
86. Chen, W. *et al.* Malignant Transformation Initiated by Mll-AF9: Gene Dosage and Critical Target Cells. *Cancer Cell* **13**, 432–440 (2008).
87. Argiropoulos, B. & Humphries, R. K. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**, 6766–6776 (2007).

88. Collins, C. T. & Hess, J. L. Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets. *Oncogene* **35**, 1090–1098 (2016).
89. Amsellem, S. *et al.* Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat. Med.* **9**, 1423–1427 (2003).
90. Thorsteinsdottir, U. *et al.* Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* **99**, 121–129 (2002).
91. Milne, T. A. *et al.* MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell* **10**, 1107–1117 (2002).
92. Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. & Cavalli, G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell* **128**, 735–745 (2007).
93. Collins, C. *et al.* C/EBP α is an essential collaborator in Hoxa9/Meis1-mediated leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 9899–9904 (2014).
94. Somervaille, T. C. P. & Cleary, M. L. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10**, 257–268 (2006).
95. Zhu, N. *et al.* MLL-AF9– and HOXA9-mediated acute myeloid leukemia stem cell self-renewal requires JMJD1C. *J. Clin. Invest.* **126**, 997–1011 (2016).
96. Tsukada, Y. -i., Ishitani, T. & Nakayama, K. I. KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev.* **24**, 432–437 (2010).
97. Ye, Q. *et al.* Genetic alterations of KDM4 subfamily and therapeutic effect of novel demethylase inhibitor in breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* **5**, 1519–1530 (2015).
98. Gray, S. G. *et al.* Functional Characterization of JMJD2A, a Histone Deacetylase- and Retinoblastoma-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 28507–28518 (2005).
99. Berry, W. L. & Janknecht, R. KDM4/JMJD2 Histone Demethylases: Epigenetic Regulators in Cancer Cells. *Cancer Res.* **73**, 2936–2942 (2013).

100. Guerra-Calderas, L., González-Barrios, R., Herrera, L. A., Cantú de León, D. & Soto-Reyes, E. The role of the histone demethylase KDM4A in cancer. *Cancer Genet.* **208**, 215–224 (2015).
101. Lee, H. J., Kim, B.-K., Yoon, K. B., Kim, Y.-C. & Han, S.-Y. Novel inhibitors of lysine (K)-specific Demethylase 4A with anticancer activity. *Invest. New Drugs* **35**, 733–741 (2017).
102. Marvalim, C. *et al.* Influence of the KDM4A rs586339 polymorphism on overall survival in Asian non-small-cell lung cancer patients: *Pharmacogenet. Genomics* **27**, 120–123 (2017).
103. Carter, D. M. *et al.* Identification of a Novel Benzimidazole Pyrazolone Scaffold That Inhibits KDM4 Lysine Demethylases and Reduces Proliferation of Prostate Cancer Cells. *SLAS Discov. Adv. Life Sci. RD* **22**, 801–812 (2017).
104. Wang, B. *et al.* Downregulation of KDM4A Suppresses the Survival of Glioma Cells by Promoting Autophagy. *J. Mol. Neurosci.* **60**, 137–144 (2016).
105. D’Oto, A., Tian, Q.-W., Davidoff, A. M. & Yang, J. Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *J. Med. Oncol. Ther.* **1**, 34–40 (2016).
106. Chen, C.-W. *et al.* DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia. *Nat. Med.* **21**, 335–343 (2015).
107. Okuda, H. *et al.* Cooperative gene activation by AF4 and DOT1L drives MLL-rearranged leukemia. *J. Clin. Invest.* **127**, 1918–1931 (2017).
108. Dong, K. B. *et al.* DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. *EMBO J.* **27**, 2691–2701 (2008).
109. Carvalho Alves-Silva, J. *et al.* Aberrant levels of *SUV39H1* and *SUV39H2* methyltransferase are associated with genomic instability in chronic lymphocytic leukemia: Association of the Levels of SUV39H1 and SUV39H2 Methyltransferase with Genomic Instability in CLL. *Environ. Mol. Mutagen.* **58**, 654–661 (2017).
110. Shirai, A. *et al.* Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *eLife* **6**, (2017).

111. Lai, Y.-S., Chen, J.-Y., Tsai, H.-J., Chen, T.-Y. & Hung, W.-C. The SUV39H1 inhibitor chaetocin induces differentiation and shows synergistic cytotoxicity with other epigenetic drugs in acute myeloid leukemia cells. *Blood Cancer J.* **5**, e313 (2015).
112. Li, L. & Bhatia, R. Role of SIRT1 in the growth and regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells: *Curr. Opin. Hematol.* **1** (2015). doi:10.1097/MOH.0000000000000152
113. Cea, M. *et al.* Synergistic Interactions between HDAC and Sirtuin Inhibitors in Human Leukemia Cells. *PLoS ONE* **6**, e22739 (2011).
114. Sonnemann, J. *et al.* Reverse chemomodulatory effects of the SIRT1 activators resveratrol and SRT1720 in Ewing's sarcoma cells: resveratrol suppresses and SRT1720 enhances etoposide- and vincristine-induced anticancer activity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 17–26 (2016).
115. Sasca, D. *et al.* SIRT1 prevents genotoxic stress-induced p53 activation in acute myeloid leukemia. *Blood* **124**, 121–133 (2014).
116. Kozako, T. *et al.* Novel small-molecule SIRT1 inhibitors induce cell death in adult T-cell leukaemia cells. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
117. Peck, B. *et al.* SIRT Inhibitors Induce Cell Death and p53 Acetylation through Targeting Both SIRT1 and SIRT2. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 844–855 (2010).
118. Asaka, R. *et al.* Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. *Lab. Invest.* **95**, 1363–1373 (2015).
119. Ma, L. *et al.* Luteolin exerts an anticancer effect on NCI-H460 human non-small cell lung cancer cells through the induction of Sirt1-mediated apoptosis. *Mol. Med. Rep.* **12**, 4196–4202 (2015).
120. Chauhan, D. *et al.* Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells: Targeting SIRT1 as Myeloma Therapy. *Br. J. Haematol.* **155**, 588–598 (2011).

121. Tsai, C. T. & So, C. W. E. Epigenetic therapies by targeting aberrant histone methylome in AML: molecular mechanisms, current preclinical and clinical development. *Oncogene* **36**, 1753–1759 (2017).
122. Gilbert, J. The Clinical Application of Targeting Cancer through Histone Acetylation and Hypomethylation. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4589–4596 (2004).
123. Lakshmikuttyamma, A., Scott, S. A., DeCoteau, J. F. & Geyer, C. R. Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition. *Oncogene* **29**, 576–588 (2010).
124. Herman, J. G. & Baylin, S. B. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042–2054 (2003).
125. Burton, A., Azevedo, C., Andreassi, C., Riccio, A. & Saiardi, A. Inositol pyrophosphates regulate JMJD2C-dependent histone demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 18970–18975 (2013).
126. Cocco, L. *et al.* Signal transduction within the nucleus: Revisiting phosphoinositide inositide-specific phospholipase C β 1. *Adv. Enzyme Regul.* **46**, 2–11 (2006).
127. Massacesi, C. *et al.* PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *OncoTargets Ther.* 203 (2016). doi:10.2147/OTT.S89967
128. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550 (2005).
129. Von Eyss, B. *et al.* A MYC-Driven Change in Mitochondrial Dynamics Limits YAP/TAZ Function in Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer. *Cancer Cell* **28**, 743–757 (2015).
130. Krieg, A. J. *et al.* Regulation of the Histone Demethylase JMJD1A by Hypoxia-Inducible Factor 1 Enhances Hypoxic Gene Expression and Tumor Growth. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 344–353 (2010).

131. Urrutia, R. *et al.* Evidence supporting the existence of a NUPR1-like family of helix-loop-helix chromatin proteins related to, yet distinct from, AT hook-containing HMG proteins. *J. Mol. Model.* **20**, (2014).
132. Vasseur, S. *et al.* p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Rep.* **3**, 165–170 (2002).
133. Goruppi, S. & Iovanna, J. L. Stress-inducible Protein p8 Is Involved in Several Physiological and Pathological Processes. *J. Biol. Chem.* **285**, 1577–1581 (2010).
134. Stein, S. J., Mack, E. A., Rome, K. S. & Pear, W. S. Tribbles in normal and malignant haematopoiesis. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 1112–1115 (2015).
135. Ohoka, N., Hattori, T., Kitagawa, M., Onozaki, K. & Hayashi, H. Critical and Functional Regulation of CHOP (C/EBP Homologous Protein) through the N-terminal Portion. *J. Biol. Chem.* **282**, 35687–35694 (2007).
136. Coutts, M., Cui, K., Davis, K. L., Keutzer, J. C. & Sytkowski, A. J. Regulated expression and functional role of the transcription factor CHOP (GADD153) in erythroid growth and differentiation. *Blood* **93**, 3369–3378 (1999).
137. Natochin, M., Lipkin, V. M. & Artemyev, N. O. Interaction of human retinal RGS with G-protein α -subunits. *FEBS Lett.* **411**, 179–182 (1997).
138. Wang, J. *et al.* Genetic variations in regulator of G-protein signaling genes as susceptibility loci for second primary tumor/recurrence in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **31**, 1755–1761 (2010).
139. Liang, G., Bansal, G., Xie, Z. & Druey, K. M. RGS16 Inhibits Breast Cancer Cell Growth by Mitigating Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 21719–21727 (2009).
140. Vivot, K. *et al.* The regulator of G-protein signaling RGS16 promotes insulin secretion and β -cell proliferation in rodent and human islets. *Mol. Metab.* **5**, 988–996 (2016).

141. Hu, L. *et al.* Downregulation of DHRS9 expression in colorectal cancer tissues and its prognostic significance. *Tumor Biol.* **37**, 837–845 (2016).