



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E  
BIOTECNOLOGIE**

**INDIRIZZO IN BIOCHIMICA E BIOFISICA**

**CICLO XX<sup>^</sup>**

**Dipartimento di Chimica Biologica**

**TESI DI DOTTORATO**

**Tyrosin-chinasi Src: studi di regolazione/deregolazione in  
cellule normali e patologiche.**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Lorenzo A. Pinna

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Arianna Donella

**Dottoranda:** Martina Frasson

31 Gennaio 2008



|                                                                                                                                |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>INDICE</b>                                                                                                                  | <b>1</b>      |
| <b>SOMMARIO</b>                                                                                                                | <b>5</b>      |
| <b>ABBREVIAZIONI DEGLI AMINOACIDI</b>                                                                                          | <b>9</b>      |
| <b>ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI</b>                                                                                              | <b>10</b>     |
| <br><b><i>INTRODUZIONE</i></b>                                                                                                 | <br><b>11</b> |
| <b>1. LE TIROSIN-CHINASI DELLA FAMIGLIA Src.</b>                                                                               | <b>13</b>     |
| <b>1.1 Introduzione</b>                                                                                                        | <b>13</b>     |
| <b>1.2 Le Tirosin-Chinasi della famiglia Src.</b>                                                                              | <b>14</b>     |
| <b>1.2.1 Dallo stato inibito a quello attivo: basi strutturali della regolazione<br/>                dell'attività di SFK.</b> | <b>17</b>     |
| <b>1.2.2. Meccanismi di attivazione delle SFK.</b>                                                                             | <b>19</b>     |
| <b>1.2.3. Meccanismi di inibizione delle SFK.</b>                                                                              | <b>24</b>     |
| <br><b><i>OBIETTIVI GENERALI</i></b>                                                                                           | <br><b>33</b> |
| <br><b><i>MATERIALI E METODI.</i></b>                                                                                          | <br><b>37</b> |
| <b>1. MATERIALI.</b>                                                                                                           | <b>39</b>     |
| <b>2. METODI.</b>                                                                                                              | <b>41</b>     |
| <b>2.1 Metodiche comuni utilizzate nei differenti studi.</b>                                                                   | <b>41</b>     |
| <b>2.2 Metodiche specifiche utilizzate per lo studio della leucemia<br/>        linfatica cronica di tipo B.</b>               | <b>45</b>     |
| <b>2.3 Metodiche specifiche utilizzate per lo studio dei disordini<br/>        mieloproliferativi.</b>                         | <b>47</b>     |
| <b>2.4 Metodi specifici utilizzati nello studio del differenziamento<br/>        muscolare.</b>                                | <b>49</b>     |
| <br><b><i>RISULTATI E DISCUSSIONE PARTE PRIMA.</i></b>                                                                         | <br><b>53</b> |
| <b>1. LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA DI TIPO B.</b>                                                                             | <b>55</b>     |
| <b>1.1 Patologia e diagnosi.</b>                                                                                               | <b>55</b>     |
| <b>1.2 Le caratteristiche molecolari del linfocita B leucemico.</b>                                                            | <b>56</b>     |
| <b>1.3 LLC: un equilibrio tra proliferazione e morte cellulare.</b>                                                            | <b>58</b>     |

|                                                                                                                                      |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.4 Signaling nella leucemia linfatica cronica: il BCR.                                                                              | 59     |
| 1.5 Lyn nella Leucemia Linfatica Cronica di tipo B.                                                                                  | 62     |
| 2. OBIETTIVI.                                                                                                                        | 65     |
| 3. RISULTATI                                                                                                                         | 67     |
| 3.1 L'elevata attivita' basale di Lyn e' correlata al suo anomalo stato di fosforilazione in B-LLC.                                  | 67     |
| 3.2 La forma attiva e citosolica di Lyn partecipa alla formazione di un complesso mediante i suoi domini SH3 e catalitico.           | 68     |
| 3.3 Natura delle interazioni presenti nel complesso citosolico di Lyn.                                                               | 70     |
| 3.4 Il dominio SH3 di Lyn promuove l'associazione della forma citosolica della chinasi con SHP-1l e HS1.                             | 72     |
| 3.5 Il dominio catalitico di Lyn interagisce con la "chaperone" Hsp90 nel complesso citosolico.                                      | 76     |
| 3.6 I domini di Lyn implicati nella formazione del complesso citosolico agiscono in modo sinergico nel mantenimento dello stesso.    | 78     |
| 3.7 Il complesso citosolico di Lyn viene destabilizzato in parallelo all'apoptosi indotta da GA.                                     | 80     |
| 4. DISCUSSIONE.                                                                                                                      | 85     |
| <br><b><i>RISULTATI E DISCUSSIONE PARTE SECONDA</i></b>                                                                              | <br>89 |
| 1. I DISORDINI MIELOPROLIFERATIVI.                                                                                                   | 91     |
| 1.1 Classificazione e caratteristiche generali.                                                                                      | 91     |
| 1.2 Ruolo di JAK2 nella patogenesi dei disordini mieloproliferativi.                                                                 | 93     |
| 2. PIASTRINE.                                                                                                                        | 98     |
| 2.1 Morfologia e funzioni delle piastrine.                                                                                           | 98     |
| 2.2 Attivazione con trombina                                                                                                         | 99     |
| 2.3 Anomalie piastriniche nei DMP.                                                                                                   | 100    |
| 3. OBIETTIVI                                                                                                                         | 103    |
| 4. RISULTATI                                                                                                                         | 105    |
| 4.1. Confronto del quadro di Tyr-fosforilazione proteica indotto da trombina nelle piastrine di soggetti sani ed affetti da PV e TE. | 105    |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2 Stato di fosforilazione di STAT5 in relazione alla presenza delle diverse forme di JAK2, normale e V617F, in soggetti sani ed affetti da PV e TE.                            | 107 |
| 4.3 Valutazione dell'attività specifica di JAK2, normale e mutata, in presenza di AG490.                                                                                         | 108 |
| 4.4 Determinazione dell'attività tirosin-chinasica Src-dipendente in piastrine di soggetti normali ed in pazienti affetti da PV e TE durante la stimolazione con trombina.       | 111 |
| 4.5 Analisi della Tyr-fosforilazione proteica durante la stimolazione a basse concentrazioni di trombina di piastrine di soggetti sani ed affetti da PV e TE.                    | 113 |
| 4.6 Determinazione dell'attività tirosin-fosfatasica in piastrine non stimulate di soggetti normali e pazienti affetti da PV e TE, in assenza o presenza di inibitori specifici. | 116 |
| 5. DISCUSSIONE.                                                                                                                                                                  | 119 |
| <br><b><i>RISULTATI E DISCUSSIONE PARTE TERZA</i></b>                                                                                                                            | 123 |
| 1.DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE.                                                                                                                                                    | 125 |
| 1.1 Espressione dei fattori di trascrizione per geni muscolo specifici                                                                                                           | 125 |
| 1.2 Arresto del ciclo cellulare.                                                                                                                                                 | 126 |
| 1.3 Differenziamento fenotipico con l'espressione dei geni muscolo-specifici.                                                                                                    | 127 |
| 1.4 Fusione cellulare e formazione dei miotubi.                                                                                                                                  | 127 |
| 1.5 Ruolo delle tirosin-chinasi Src nel differenziamento muscolare.                                                                                                              | 128 |
| 2. OBIETTIVI.                                                                                                                                                                    | 131 |
| 3. RISULTATI.                                                                                                                                                                    | 133 |
| 3.1 Identificazione di substrati Tyr-fosforilati durante il differenziamento muscolare: Grp94.                                                                                   | 133 |
| 3.2 Analisi dello stato di fosforilazione di Grp94 durante il differenziamento di cellule C2C12.                                                                                 | 134 |
| 3.3 Fyn interagisce e fosforila Grp94 durante il differenziamento di cellule C2C12.                                                                                              | 136 |
| 3.4 Migrazione di Grp94 dal reticolo endoplasmatico alla membrana                                                                                                                |     |

|                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| plasmatica di cellule C2C12 durante il differenziamento.                                                                                     | 138 |
| 3.5 Identificazione del compartimento sub-cellulare in cui Fyn e Grp94 interagiscono.                                                        | 141 |
| 3.6 Valutazione della localizzazione di Grp94 nell'Apparato del Golgi durante il differenziamento di cellule C2C12.                          | 144 |
| 3.7 Ruolo della Tyr-fosforilazione di Grp94 nella formazione di un complesso molecolare specifico dello stato di differenziamento muscolare. | 146 |
| 4. DISCUSSIONE.                                                                                                                              | 149 |
| BIBLIOGRAFIA                                                                                                                                 | 153 |

## SOMMARIO

Le tirosin-chinasi della famiglia Src (SFK) giocano un ruolo importante nella regolazione della trasduzione del segnale mediata dai recettori di membrana nel compartimento citoplasmatico. SFK sono enzimi che controllano la crescita, il differenziamento, la migrazione e la sopravvivenza cellulare. L'attività di queste chinasi è regolata, a livello cellulare, dallo stato di fosforilazione di due residui tirosinici chiave e dall'interazioni con ligandi mediate dai suoi domini regolatori, che stabilizzano la chinasi in conformazione attiva od inattiva.

Nelle normali condizioni cellulari, l'attività di SFK è finemente regolata tanto che una disfunzione nei meccanismi di regolazione di tali chinasi può determinarne un'attivazione costitutiva causa, almeno in parte, dell'insorgenza di molte patologie, tra le quali il cancro.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare i possibili meccanismi molecolari alla base di un'aberrante attività SFK in due patologie neoplastiche ed il ruolo dell'attività Src-dipendente nel differenziamento muscolare.

Nella leucemia linfatica cronica di tipo B, causata dall'accumulo di cellule B scarsamente proliferanti ma con un difetto nel processo di morte cellulare programmata, i nostri risultati indicano che la Src-chinasi Lyn è inclusa in un complesso citosolico multiproteico del peso molecolare di circa 600 kDa. Lyn, partecipa, nella sua forma iper-attiva, alla formazione del complesso associandosi a diverse proteine quali Hsp90 attraverso il suo dominio catalitico, e HS1 e SHP-1L per mezzo del suo dominio SH3. L'inclusione della chinasi nel complesso impedisce la degradazione di Lyn che cumula anormale nel citosol di cellule leucemiche. Il trattamento con geldanamicina, un inibitore di Hsp90, induce inattivazione e degradazione di Lyn citosolico parallelamente ad un ripristino dell'apoptosi cellulare.

Nelle piastrine dei pazienti affetti da disordini mieloproliferativi-Ph negativi, che sono disordini clonali ematopoietici, i nostri risultati dimostrano che la tirosin-chinasi Src è defosforilata a livello della tirosina inibitoria Y527 presente nel C-terminale grazie all'interazione con un regolatore positivo dell'attività SFK come la tirosin-fosfatasi SHP-2. Questa forma pre-attivata di Src correla con uno stato di ipersensibilizzazione delle piastrine DMP, le quali si attivano a basse concentrazioni di trombina, condizioni in cui le piastrine normali non si stimolano.

In cellule muscolari murine C2C12 abbiamo dimostrato che, durante le prime fasi del processo di differenziamento, la Src-chinasi Fyn si attiva e fosforila Grp94 nel lume del reticolo endoplasmatico. L'evento è associato al rilascio di Grp94 dal reticolo, dove la proteina è residente, ed alla sua traslocazione prima all'Apparato del Golgi e successivamente alla membrana plasmatica, dove è stato precedentemente dimostrato mediare il processo di fusione dei mioblasti.

Questi risultati indicano che la Tyr-fosforilazione di Grp94, catalizzata da Fyn, gioca un ruolo importante nel traffico sub-cellulare della proteina, che avviene durante il differenziamento del muscolo scheletrico.

## Abstract

The Src family of protein kinases (SFKs), plays an important role in regulating the signal transduction by cell surface receptors to the cytoplasmic machinery. SFK enzymes are involved in cell growth, differentiation, migration and survival. SFK activity is regulated in the cell by the phosphorylation state of two tyrosine residues and by the binding of protein-partners, that stabilize the kinases in their active or inactive conformation. In normal cells, the SFK activity is tightly regulated and aberration in its mechanisms of regulation can lead to the constitutive activation, which contributes to several pathologies, including cancer.

The aim of this work was to gain deeper insight into the molecular mechanisms, which give rise to the aberrant regulation of SFK activity in two hematopoietic malignancies. Moreover, we analyzed the signaling of Src-kinase Fyn during muscle differentiation.

B cell chronic lymphocytic leukemia is a pathology caused by the accumulation of slowly proliferating cells with defective apoptosis. Our results indicate that, in these leukemic cells, the Src-kinase Lyn is present in its hyperactive conformation as an integral component of an aberrant cytosolic multiprotein complex of 600 kDa. In this complex, the kinase is physically associated with several proteins, such as Hsp90 through its catalytic domain, and HS1 and SHP-1L through its SH3 domain. Treatment of B-CLL cells with geldanamycin, an Hsp90 inhibitor, abrogates cytosolic Lyn activity, induces the kinase degradation and promotes cellular apoptosis.

In platelets of Philadelphia negative myeloproliferative diseases, that are clonal hematopoietic disorders, our data demonstrate that, at variance with normal cells, Src kinase is not phosphorylated at the C-terminus inactivating tyrosine Y527. This pre-activated conformation of Src is responsible for the basal hypersensitivity of the pathological platelets, which are greatly activated by low thrombin concentrations, which are ineffective towards normal platelets.

In C2C12 murine muscle cells, we demonstrated that, in the early phase of the differentiation process, the Src-kinase Fyn phosphorylates the chaperone Grp94 in the lumen of the endoplasmic reticulum. This event is associated with the release of Tyr-phosphorylated Grp94 from the endoplasmic reticulum chaperone protein

Grp94 and the chaperone translocation to the Golgi apparatus and plasma membrane, where Grp94 has been demonstrated to be required for myotube formation.

## ABBREVIAZIONI DEGLI AMINOACIDI.

|   |   |                      |   |                 |
|---|---|----------------------|---|-----------------|
| A | = | Ala                  | = | Alanina         |
| C | = | Cys                  | = | Cisteina        |
| D | = | Asp                  | = | Acido Aspartico |
| E | = | Glu                  | = | Acido Glutamico |
| F | = | Phe                  | = | Fenilalanina    |
| G | = | Gly                  | = | Glicina         |
| H | = | His                  | = | Istidina        |
| I | = | Ile                  | = | Isoleucina      |
| K | = | Lys                  | = | Lisina          |
| L | = | Leu                  | = | Leucina         |
| M | = | Met                  | = | Metionina       |
| N | = | Asn                  | = | Asparagina      |
| P | = | Pro                  | = | Prolina         |
| Q | = | Gln                  | = | Glutamina       |
| R | = | Arg                  | = | Arginina        |
| S | = | Ser                  | = | Serina          |
| T | = | Thr                  | = | Treonina        |
| V | = | Val                  | = | Valina          |
| W | = | Trp                  | = | Triptofano      |
| Y | = | Tyr                  | = | Tirosina        |
| X | = | amminoacido generico |   |                 |

## DEFINIZIONE DELLE ABBREVIAZIONI

**BSA** = Albumina di siero bovino

**Cdc2** = Cell division cycle 2

**EDTA** = Acido etilen-diammino-tetracetico

**EGTA** = Acido etilen-glicol-bis2-aminoetiletere NNN'N'tetracetico

**FITC** = Fluorescein IsoThioCyanato

**HEPES** = Acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazin-etan-sulfonico

**Ig** = Immunoglobulin

**PAGE** = Polyacrylamide gel electrophoresis

**PBS** = Soluzione di fosfati tamponati

**RPMI** = terreno ricco in vitamine ed amminoacidi ottenuto al Roswel Park Memorial Institute

**SDS** = Sodio dodecil solfato

**TRIS** = Tris-(idrossimetil)-aminometano

**[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP** = ATP marcato con fosforo radioattivo in posizione  $\gamma$

## TIROSIN-CHINASI DELLA FAMIGLIA Src

**BLK** = B-lymphoid tyrosine kinase

**FGR** = Gardner-Rachet feline sarcoma

**FYN** = Oncogene related to Src, Fgrb, Yes

**HCK** = Hemopoietic cell kinase

**LCK** = Lymphocyte specific protein tyrosine kinase

**LYN** = Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog

**SRC** = Rous sarcoma

**YES** = Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1

**YRK** = Tyrosine phosphorylation regulated kinase

# ***Introduzione***



## **LE TIROSIN-CHINASI DELLA FAMIGLIA Src.**

### **Introduzione.**

Le protein-chinasi sono enzimi deputati al controllo di numerose funzioni cellulari mediante la fosforilazione di residui di serina, treonina o tirosina, in specifiche proteine bersaglio implicate nella crescita, nel differenziamento, nell'espressione genica, nel metabolismo, nel traffico cellulare e nell'apoptosi. Affinché questi processi siano realizzati, è necessario che vi sia una specifica interazione tra la chinasi e il suo substrato: la fosforilazione infatti promuove la formazione di complessi multi-proteici coinvolti nella trasduzione del segnale. Dato il ruolo critico svolto nell'omeostasi cellulare, la regolazione dell'attività enzimatica sarà fondamentale. L'attività chinasica, infatti, è finemente regolata, tanto che una deregolazione dei meccanismi che la governano può essere associata a molteplici forme di patologie, incluso il cancro (1,2).

Nel genoma umano sono 518 le chinasi codificate, di cui 430 con possibile attività catalitica (1,2). Basandosi sull'omologia di sequenza, il più grande gruppo identificato è quello delle tirosin-chinasi comprendenti circa 100 membri. Le tirosin-chinasi sono deputate al trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP a residui tirosinici presenti in specifiche sequenze aminoacidiche delle proteine bersaglio. Questa categoria può essere ulteriormente suddivisa in due gruppi: le tirosin-chinasi recettoriali (RTK) e le tirosin-chinasi non recettoriali (nRTK).

Le RTK sono recettori di membrana con attività tirosin-chinasica, infatti consistono di: un dominio extracellulare per l'interazione con il ligando; una sequenza trans-membrana ed un dominio chinasico intracellulare. L'interazione del ligando con la porzione extracellulare del recettore determina la dimerizzazione dello stesso. Tale evento promuove l'attivazione della chinasi mediante autofosforilazione del dominio catalitico intracellulare permettendo la trasduzione del segnale all'interno della cellula.

Le nRTK invece sono molecole trasduttrici del segnale prive delle porzione extracellulare e trans-membrana anche se possono essere legate direttamente o indirettamente ai recettori di membrana. Le nRTK mediano la risposta agli stimoli esterni mediante l'uso di unità modulari (domini) che hanno attività chinasica (dominio catalitico), attività regolatoria o di modulazione dell'interazione proteina-

proteina come i domini SH3 (Src Homology 3), SH2 (Src Homology 2) e PH (Pleckstrin Homology), o di localizzazione sub-cellulare determinata da modificazioni post-traduzionali quali la miristoilazione o la palmitoilazione.

Nei mammiferi sono 10 le famiglie di tirosin-chinasi non recettoriali identificate e tra queste la più rappresentativa è quella delle tirosin-chinasi della famiglia Src (SFK) (1).

## 1.2 Le Tirosin-chinasi della Famiglia Src.

Gli studi su SFK originano nel lontano 1911 quando Peyton Ruos focalizzò la sua attenzione sull'attività trasformante del Rous sarcoma virus (3). In seguito, si determinò che quest'attività era dovuta al gene *v-Src* ed in particolare alla proteina virale codificata *v-Src*, denominata anche pp60<sup>v-Src</sup>, nota come la prima tirosin-chinasi Src identificata (4). Più tardi Stehelin ed i suoi collaboratori determinarono l'esistenza di un gene *c-Src* fisiologicamente presente in cellule non trasformate: si era così individuato il primo proto-oncogene (5).

La famiglia delle tirosin-chinasi Src consiste di nove membri così elencati: Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes and Yrk. Mentre Src, Fyn, Yes e Yrk sono ubiquitariamente espressi; Hck, Lyn, Lck, Fgr e Blk si trovano quasi esclusivamente nelle cellule di origine ematopoietica (6).

Le tirosin-chinasi Src sono considerate dei prototipi modello di proteine modulari del segnale come mostrato in Figura 1 (7,8).



*Biochim Biophys Acta*, 2002. 602: 114-130.

**Figura 1: Domini strutturali della tirosin-chinasi c-Src.**

Tutti i membri infatti conservano un'organizzazione strutturale in domini che includono dall'estremità N-terminale:

➤ un dominio SH4 (Src Homology 4) che comprende i primi 16 residui aminoacidici ed è responsabile dell'interazione delle SFK alle membrane cellulari (Figura 1). E' noto infatti che SFK sono localizzate dal lato citosolico della mem-

brana plasmatica, anche se dati recenti hanno dimostrato che possono associare agli endosomi, alle vescicole secretorie, all'apparato del Golgi, al mitocondrio e alla membrana perinucleare (9-13). L'ancoraggio delle SFK alle membrane è favorito dall'acilazione specifica di due residui aminoacidici presenti nella sequenza consenso Met-Gly-Cys della regione N-terminale. Tutte le tirosin-chinasi Src sono miristoilate a livello della Gly in posizione +2. Benchè questa reazione sia irreversibile, si è dimostrata alcune volte insufficiente ad una corretta localizzazione delle SFK. Infatti, sette membri su nove sono palmitoilati a livello della Cys in posizione +3, altre invece utilizzano (come nel caso di c-Src) delle interazioni elettrostatiche con i lipidi di membrana promosse da residui basici, in particolare delle lisine, presenti nella regione N-terminale (14).

- un dominio unico diverso per tutti i membri e di cui non si conosce ancora la funzione;
- un dominio SH3 (Src Homology 3), costituito da 50-60 residui aminoacidici e con una funzione non catalitica in quanto media interazioni proteina-proteina intra- ed inter-molecolari coinvolte nel controllo dell'attività enzimatica, dell'interazione con i substrati e della localizzazione sub-cellulare (Figura 1). Il dominio presenta una struttura a  $\beta$  barile con 5 foglietti antiparalleli e 2 loops denominati RT e n-Src. Quest'ultimi si trovano alla fine di una superficie ricca in aminoacidi aromatici ed idrofobici che delimita la regione di riconoscimento della sequenza in prolina del motivo consenso PXXP presente nella proteina partner. Quando il dominio SH3 interagisce con il motivo PXXP, questi adotta una conformazione ad elica poli-prolinica di tipo II (PPII). Per le tirosin-chinasi Src esistono dei determinanti di specificità e di affinità di legame derivanti dall'orientazione della coordinazione dei residui di Arg o Lys presenti al lato N-terminale (definendo ligandi di classe I) o al C-terminale (definendo ligandi di classe II) del core PXXP. L'interazione mediata dal dominio SH3 con la sequenza PXXP della proteina partner è a bassa affinità tanto che variazioni della sequenza aminoacidica nel consenso possono aumentare o diminuire l'affinità di binding per il substrato (7,8).
- un dominio SH2 (Src Homology 2), costituito da circa 100 residui aminoacidi, con funzione non catalitica poiché modula, mediante interazione proteina-proteina, l'attività catalitica o il riconoscimento dei substrati (Figura 1). Il do-

minio ha una struttura a foglietto  $\beta$  centrale e 2 singole  $\alpha$  eliche ai lati di quest'ultimo. Gli elementi di struttura secondaria ed i loops che li connettono costituiscono due siti di riconoscimento del motivo consenso della proteina partner: uno per la tirosina fosforilata (pTyr) ed uno di interazione per gli aminoacidi presenti al C-terminale rispetto alla pTyr. Studi cristallografici hanno dimostrato che un residuo di Arg altamente conservato (Arg175 in c-Src) situato nella tasca di riconoscimento di pTyr è determinate per le interazioni elettrostatiche con questa.

Le SFK hanno dei determinanti di specificità nel riconoscimento della pTyr, questa infatti deve essere inclusa in una sequenza consenso pY-E-E-I dove Ile in posizione +3 interagisce con il pocket idrofobico del dominio SH2 di SFK. Le interazioni polari ed elettrostatiche che stabilizzano l'interazione SH2-mediata sono favorite dalla presenza dei residui di Glu in posizione +1 e +2, anche se la sostituzione di questi non ha determinato sostanziali variazioni nella capacità di binding (7,8).

➤ un dominio SH1 (Src Homology 1) o catalitico, costituito da circa 260 aminoacidi, è responsabile dell'attività enzimatica (Figura 1). Questo presenta una caratteristica struttura bilobata comune a tutte le Ser/Thr e Tyr-chinasi. Si possono distinguere: il lobo N-terminale (o piccolo lobo) costituito da 5 foglietti  $\beta$  ed una singola  $\alpha$  elica (chiamata anche elica C); il lobo C-terminale (o grande lobo) è costituito prevalentemente da  $\alpha$  eliche. Il piccolo lobo è coinvolto primariamente nell'ancoraggio e nell'orientamento dell'ATP. Il legame con il nucleotide fosfato è coordinato in parte da una zona ricca in glicina detta G-loop (è comunemente chiamata anche P-loop dove P indica il gruppo fosfato dell'ATP). Il grande lobo è coinvolto nel legame con il substrato e contiene il sito di attivazione in cui compare la Tyr416 ( $Y_A$ ) (in c-Src) la cui fosforilazione determina la completa attivazione dell'enzima.

Nella fessura tra i due lobi si trova il sito catalitico dove avviene il trasferimento del fosfato dall'ATP al substrato. Strutturali deformazioni dei due lobi possono determinare delle variazioni dell'angolo di apertura del core catalitico tali da permettere l'accesso all'ATP al core ed il rilascio di ADP. Le diverse conformazioni assunte dai due lobi generano così una diversa accessibilità alla tasca catalitica tale da promuovere o inibire l'attività enzimatica.

Nel core catalitico si trovano diversi residui aminoacidi altamente conservati: la Lys295 implicata nella formazione di legami ionici con i fosfati  $\alpha$  e  $\beta$  dell'ATP; Asp386, chiamato anche aspartico catalitico, responsabile dell'orientazione dei gruppi tirosinici del substrato ed accettore di protoni da parte della Tyr che deve essere fosforilata facilitando l'attacco nucleofilo del fosforo  $\gamma$  dell'ATP. Altro residuo fondamentale che si trova nel loop di attivazione del grande lobo è Asp404, il quale lega gli ioni  $Mg^{2+}$  che coordinano i fosfati  $\beta$  e  $\gamma$  dell'ATP (7,8).

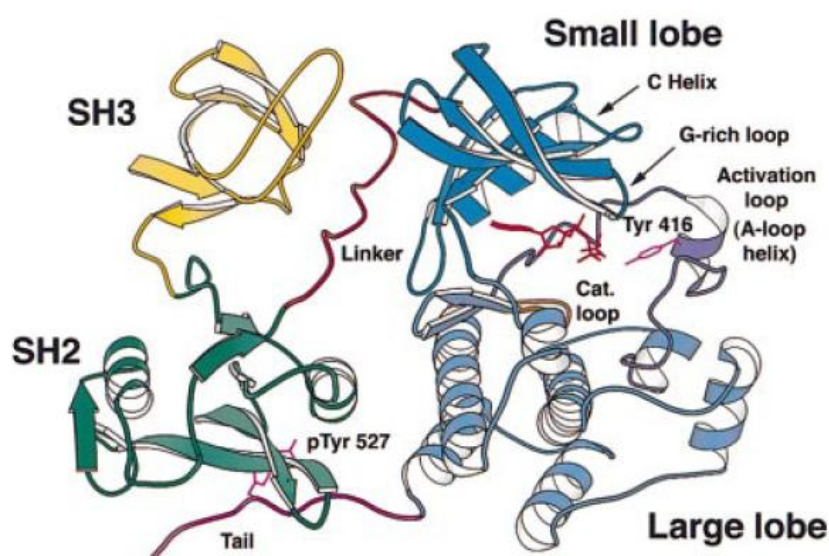
➤ una regione C-terminale costituita da circa 15-17 residui aminoacidici che contiene una Tyr in posizione 527 (in c-Src) altamente conservata in tutte le SFK (Figura 1). La Tyr527 ( $Y_T$ ) è un'importante sito regolatorio in quanto la sua fosforilazione determina dei cambiamenti conformazionali dovuti all'interazione intramolecolare della pTyr527 con il dominio SH2 tali da inattivare la chinasi. La fosforilazione della Tyr527 è determinata dall'azione di due tirosin-chinasi come Csk (C-terminal Src kinase) ed il suo omologo Chk (Csk-homologous kinase) (15). In condizioni basali *in vivo*, il 90-95% di Src è fosforilata in Tyr527. L'importanza della fosforilazione della Tyr527 nel meccanismo di inibizione dell'attività chinasica di c-Src è suggerita da evidenze sperimentali in cui mutanti di c-Src Tyr527Phe presentano una costitutiva attività basale associata alla comparsa di trasformazioni cellulari anche di natura cancerogena (16).

### **1.2.1 Dallo stato inibito a quello attivo: basi strutturali della regolazione dell'attività di SFK.**

Uno dei più importanti meccanismi di regolazione di SFK è lo stato di fosforilazione di due residui aminoacidici chiave:  $Y_A$  nel loop di attivazione e la  $Y_T$  nella coda C-terminale.

Dalla struttura cristallizzata della forma fosforilata p $Y_T$  di c-Src e Hck, si evince che la conformazione inattiva della chinasi è determinata dalle interazioni intramolecolari mediate dai suoi domini regolatori SH2 e SH3 (17,18). Mentre il dominio SH2 lega p $Y_T$  della coda C-terminale, il dominio SH3 interagisce con il segmento linker tra il dominio SH2 ed il dominio catalitico (chiamato anche SH2-kinase linker). Queste modificazioni conformazionali permettono da un lato al dominio SH2 di avvicinarsi al grande lobo, dall'altro al dominio SH3 di accostarsi

al piccolo lobo. L'analisi delle sequenze aminoacidiche coordinate dai due domini ha dimostrato che sono dei siti di legame a bassa affinità. Infatti, SH2-kinase linker non presenta una classica sequenza consenso PXXP, anche se assume una struttura ad elica PPII in associazione al dominio SH3. Inoltre in posizione pY+3 della pY<sub>T</sub> si trova una glicina e non una isoleucina come da sequenza consenso preferenziale. Le posizioni così assunte dai due domini non occludono stericamente la tasca catalitica ma determinano delle distorsioni del sito attivo tali da renderlo inattivo.



*Biochem Biophys Res Comm*, 2004. 324: 1155-1164.

**Figura 2. Diagramma a nastro che illustra la struttura di c-Src.** Il loop di attivazione è tra i due lobi e sequestra la Tyr416.

L'interazione mediata dal dominio SH3 permette al Trp260 del "SH2-kinase linker" di inserirsi nella tasca idrofobica definita dalla Leu308 e dall'Ala311 del  $\alpha$ -elica C e dalla Leu325 e Val328 del  $\beta$ -strand del dominio catalitico. In questo modo l' $\alpha$ -elica C assume un'orientazione non compatibile con l'attività catalitica. Infatti, il residuo Glu310 in essa conservato viene rimosso dal sito attivo impedendo così la formazione del ponte salino con la Lys295. La mancanza di quest'interazione non permette alla Lys295 di coordinare correttamente le molecole di ATP (7,8).

In parallelo, il loop di attivazione forma una piccola  $\alpha$ -elica (chiamata anche “A-loop helix”) che spinge la  $Y_A$  tra i due lobi del dominio catalitico rendendo inaccessibile il sito attivo ai substrati. Questa configurazione inattiva della tirosin-chinasi viene stabilizzata da un ponte salino tra Glu310 ed Arg409.

La transizione dalla forma inibita a quella attiva della chinasi è definita da modifiche conformazionali per cui  $\alpha$ -elica C ruota e facilita la formazione del ponte salino tra la Glu310 e la Lys295, tanto che quest’ultima può così coordinare al meglio le molecole di ATP. Il loop di attivazione invece assume una forma più distesa permettendo ai substrati di inserirsi nel sito attivo ed alla  $Y_A$  di essere fosforilata stabilizzando la chinasi in conformazione attiva (7,8).

### **1.2.2. Meccanismi di attivazione delle SFK.**

La forma chiusa-inattiva e la forma aperta-attiva delle SFK esistono in un dinamico equilibrio. Poiché l’attività delle tirosin-chinasi Src è finemente regolata nelle normali condizioni cellulari, una modificazione dei meccanismi che la governano può determinare una costitutiva attivazione di SFK. La destabilizzazione della forma chiusa è determinata da diversi fattori: la defosforilazione della coda C-terminale, la destabilizzazione delle interazioni intramolecolari SH2 e SH3 dipendenti mediante l’ausilio di ligandi esterni, autofosforilazione della  $Y_A$  (19).

**Defosforilazione della  $pY_T$ .** In letteratura sono descritte 4 tirosin-fosfatasi implicate nel meccanismo di defosforilazione della  $pY_T$  delle SFK in vari sistemi cellulari: (i) tyrosine-phosphatase 1B (PTP1B), (ii) tirosin-fosfatasi transmembrana CD45 e (iii) tirosin-fosfatasi contenenti due domini SH2 in tandem SHP-1 e SHP-2.

PTP1B è stata la prima tirosin-fosfatasi identificata. E’ classificata come enzima citoplasmatico in quanto manca della porzione trans-membrana presente ad esempio in CD45. PTP1B è ubiquitariamente espressa ed è implicata nella regolazione dell’attività di SFK catalizzando la defosforilazione di  $pY_T$  in molti sistemi cellulari (19). Bjorge e i suoi collaboratori sostengono che la deregolazione di PTP1B è associata all’insorgenza del cancro al polmone: si registra infatti un aumento dell’attività fosfataseica parallelo ad un aumento dell’attività tirosin-chinasica

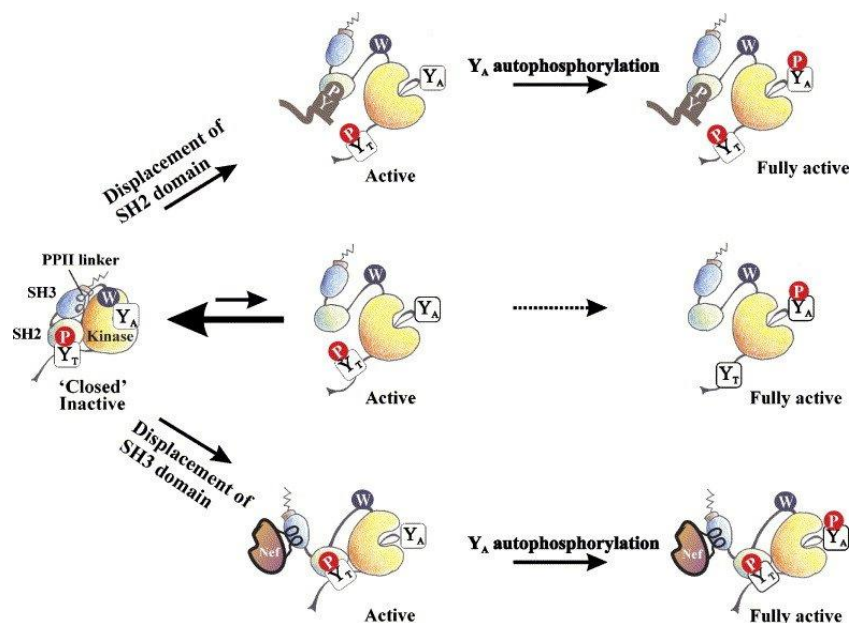
SFK-dipendente in cellule neoplastiche di origine polmonare rispetto a quelle normali (20).

CD45 è una tirosin-fosfatasi presente sulla membrana plasmatica ed è abbondantemente espressa in tutte le cellule nucleate di origine ematopoietica. Presenta una funzione critica nella trasduzione del segnale mediata dal recettore poiché si nota un arresto dello sviluppo delle cellule B e T in topi deficienti in CD45. Questa è la più importante fosfatasi che attiva SFK mediante defosforilazione di pY<sub>T</sub> (19,21,22).

SHP-1 e SHP-2 sono due tirosin-fosfatasi localizzate nel citosol e contenenti due domini SH2 al lato N-terminale ed un dominio catalitico nella coda C-terminale (23). Benchè siano strutturalmente correlate, SHP-1 e SHP-2 svolgono diversi ruoli nella trasduzione del segnale: mentre SHP-1 ha effetti di tipo inibitorio, SHP-2 è coinvolta nella trasduzione del segnale che determina attivazione cellulare. Queste fosfatasi sono anche differentemente espresse, infatti SHP-1 è primariamente presente nelle cellule di origine ematopoietica, SHP-2 è invece ubiquitaria. Evidenze sperimentali hanno stabilito che SHP-1 è implicata nella defosforilazione della pY<sub>T</sub> e nell'attivazione di c-Src (24). In cellule ovariche HEY, trasfettate con costrutti codificanti SHP-1 wild-type ed un dominante negativo cataliticamente incompetente (Cys453Ser), si è dimostrato che vi era un'iper-attivazione di c-Src in cellule over-esprimenti SHP-1 wild-type ed una mancata attivazione in quelle esprimenti il dominante negativo. Recenti dati bibliografici hanno dimostrato invece che SHP-2 può regolare l'attività di SFK con diverse modalità: mediante un meccanismo enzimatico che prevede la defosforilazione della coda C-terminale, ed uno non enzimatico legato al controllo del reclutamento di Csk alla membrana plasmatica. In questo caso, la defosforilazione, catalizzata da SHP-2, della proteina PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains), che in stato fosforilato recluta il dominio SH2 di Csk, coincide con la mancata localizzazione alla membrana di Csk stessa e conseguente incapacità di inibire le SFK (25).

**Destabilizzazione delle interazioni intramolecolari mediate dai domini SH3 e SH2.** E' ampiamente documentato che l'attivazione di SFK può essere determinata anche dalla diretta perturbazione delle interazioni intramolecolari mediate dal dominio SH3 con il segmento PPII-linker e dal dominio SH2 con la pY<sub>T</sub>.

Si conoscono numerosi ligandi in grado di competere con l'interazione SH3/PPII-linker di SFK come: il recettore del progesterone, p130<sup>CAS</sup>, AFAP-110 e Nef, proteina accessoria del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1). Studi di interazione avevano dimostrato che Nef legava il dominio SH3 di Hck con elevata affinità (26). In seguito, esperimenti eseguiti *in vitro* con proteine purificate determinarono che la forma inibita di Hck veniva attivata dal legame di Nef con il dominio SH3 della chinasi per dissociazione dell'interazione intramolecolare mediata dal dominio SH3 (27). Inoltre, *in vivo*, l'espressione di Nef comportava attivazione costitutiva SH3-dipendente di Hck in fibroblasti che presentavano un fenotipo trasformato. Sorprendentemente, l'attivazione SH3-mediata di Hck era indipendente dall'interazione del dominio SH2 con la coda C-terminale. In questo contesto è stata osservata l'autofosforilazione della Y<sub>A</sub> della chinasi in assenza della defosforilazione della pY<sub>T</sub> ed il suo rilascio dal dominio SH2 (28). La capacità di attivazione di Hck da parte di Nef è mantenuta in presenza di mutazioni nell'intorno della Y<sub>T</sub> nella coda C-terminale di Hck che rendono l'interazione con il dominio SH2 ad alta affinità (29). Questi risultati dimostrano che è sufficiente la dissociazione della sola interazione mediata dal dominio SH3 con il segmento PPII-linker di Hck affinché vi sia una completa attivazione della tirosin-chinasi (Figura, 3).



Biochim. Bioph. Acta 2005. 1754: 210-220.

**Figura 3. Differenti modalità di attivazione di pY-SFK dallo stato inattivo a quello attivo.**

D'altra parte anche la rottura del legame intramolecolare tra pY<sub>T</sub> ed il dominio SH2 è responsabile dell'induzione dell'attivazione della chinasi. E' stato riportato che *in vitro* l'uso di un peptide contenente il motivo pYEEI e corrispondente alla sequenza del polyoma virus middle T antigen-derived, attiva Hck per dissociazione diretta dell'interazione della pY<sub>T</sub> con il dominio SH2 pur preservando quella SH3-mediata. La conferma di questi dati preliminari è stata ottenuta *in vivo* modificando la sequenza PPII-linker di Hck rendendola un ligando intramolecolare ad alta affinità per il dominio SH3 (30). In presenza infatti di un ligando per il dominio SH2, si ha un aumento dell'attività catalitica che si traduce in un segnale di trasformazione fenotipica per i fibroblasti trattati. Questi dati dimostrano che il rilascio dell'interazione SH3-linker non è richiesta per l'attivazione indotta dalla dissociazione pY<sub>T</sub>-SH2. Dopo la dissociazione dell'interazione pY<sub>T</sub>-SH2, la tirosina inibitoria è accessibile alle fosfatasi. La defosforilazione di pY<sub>T</sub> coincide con la distruzione di tutte le interazioni intramolecolari ed è seguita dalla fosforilazione del sito attivatorio che induce una completa attivazione della chinasi (Figura, 3). Il binding con ligandi esterni permette comunque alle SFK di autofosforilarsi e di rimanere attive anche in presenza della fosforilazione di Y<sub>T</sub>. Questo indica che la fosforilazione della tirosina inibitoria e l'interazione intramolecolare che ne deriva non sono sufficienti a mantenere l'attività SFK in uno stato completamente inibito *in vivo* (Figura, 3).

**Mutagenesi del segmento linker tra il dominio SH2 e catalitico.** La struttura dei cristalli di Src e Hck ha dimostrato come l'attività chinasica sia finemente regolata da interazioni intramolecolari che coinvolgono la superficie dei domini SH3 e SH2. Nella conformazione chiusa ed inibita, i domini SH3 ed SH2 si trovano allineati dietro al dominio catalitico, in particolare il segmento SH2-linker si posiziona tra la superficie di binding del dominio SH3 e quella del piccolo lobo interagendo con entrambe e fungendo da adattatore per le due interazioni. Al fine di determinare il possibile coinvolgimento di SH2-linker nella regolazione di SFK, Gonfloni ed i suoi collaboratori mutarono in c-Src ed Lck, la Lys249 e la Pro250 in Glu e Gly rispettivamente (i due residui aminoacidici sono altamente conservati in tutte le SFK) (31). L'espressione dei mutanti in cellule di *Schizosaccharomyces pombe* coincideva con un'estensiva Tyr-fosforilazione basale di substrati endogeni compatibile con una costitutiva attività basale Src-dipendente. La

completa deregolazione ed attivazione di Src e Lck, ottenute per mutazione del segmento SH2-linker, erano inoltre comparabili con risultati ottenuti per mutazione della Y527F o di residui situati nella tasca di legame del dominio SH2.

**Mutagenesi del segmento linker SH3-SH2.** Le interazioni intramolecolari mediate dai domini SH3 ed SH2 cooperano attivamente nel ridurre la flessibilità conformazionale del dominio catalitico, impedendo così l'attivazione della chinasi. Questa sinergia è mediata da un piccolo segmento, chiamato "SH3-SH2 connector", che unisce i due domini prima citati e che si riteneva non ricoprire ruoli chiave nel meccanismo di regolazione delle SFK. Quando i due domini sono legati ai loro siti di docking interni, i residui del SH3-SH2 connector assumono una struttura rigida che impedisce la transizione conformazionale che induce l'attivazione della chinasi. Il rilascio dell'interazione pY<sub>T</sub>-SH2, che non implica comunque la destabilizzazione di quella SH3-mediata, determina un aumento della flessibilità nella regione del connettore che permette la fosforilazione della tirosina attivatoria e la completa attivazione della chinasi. Questi risultati ottenuti mediante studi NMR sono stati successivamente validati grazie alla costruzione di un mutante c-Src, i cui tre residui del connettore erano stati sostituiti con delle glicine (32). L'espressione del costrutto coincideva con una forma costitutivamente attiva della chinasi. La flessibilità del linker può inoltre indurre un aumento della disponibilità dei due domini all'interazione con ligandi esterni. Il ruolo attribuito al "SH3-SH2 connector" è comune ad alcuni linkers presenti nei "zinc-fingers" di certi fattori di trascrizione. Queste strutture linkers vengono denominate come "inducibile snap locks" che in c-Src evidenziano un meccanismo di auto-inibizione.

**Interazione del lobo N-terminale del dominio catalitico con altre proteine.** Le proteine "chaperone" come Hsp90 sono implicate nel mantenimento della stabilità e dell'attività di proteine "clienti", incluse le protein-chinasi della famiglia Src (33). L'interazione avviene per riconoscimento da parte di Hsp90 di una superficie nel lobo N-terminale del dominio catalitico (34). Il complesso così formato è stabilizzato da interazioni a bassa affinità con cui Hsp90 può mantenere i suoi clienti in un latente ma reale stato attivato. Di norma l'associazione di c-Src e di altri membri della famiglia con Hsp90 è difficile da evidenziare nelle normali condizioni cellulari. Al contrario v-Src, forma virale costitutivamente attiva di

Src, mostra una stabile e fisica associazione con Hsp90 (35,36). Questo è riconducibile ad una diversa affinità di binding di Hsp90 per le sue proteine clienti: l'interazione di Hsp90 con le "co-chaperone" Hsp70 e cdc37 determina variazioni conformazionali del sito di binding per l'ATP tali per cui si ha un aumento dell'affinità di Hsp90 per i suoi ligandi (37). La formazione del complesso "multi-chaperone" è fondamentale per lo stato di attivazione di Hsp90.

### 1.2.3. Meccanismi di inibizione delle SFK.

Nelle normali condizioni cellulari esiste una vasta gamma di inibitori che coopera attivamente all'inattivazione dell'attività tirosin-chinasica Src-dipendente. Gli inibitori endogeni possono essere suddivisi in due classi: (i) catalitici e (ii) non catalitici. Sono definiti come catalitici quegli enzimi deputati all'inattivazione dell'attività SFK mediante defosforilazione della tirosina attivatoria ad opera di tirosin-fosfatasi, o fosforilazione della tirosina inibitoria mediata da Csk e Chk (38).

**Inibitori endogeni catalitici: Tirosin-fosfatasi che defosforilano  $pY_A$  di SFK.** In letteratura sono tre le tirosin-fosfatasi implicate nella defosforilazione di  $pY_A$ : (i) proline-enriched tyrosine phosphatase (PEP), (ii) CD45 e (iii) SHP-1.

Nelle cellule di origine ematopoietica, la defosforilazione di  $pY_A$  per mezzo di PEP è preceduta dalla formazione di un complesso tra PEP e Csk. Questo evento è reso possibile dall'interazione tra il motivo PXXP della fosfatasi ed il dominio SH3 di Csk. La successiva defosforilazione della  $pY_A$  mediata da PEP e la fosforilazione di  $pY_T$  ad opera di Csk determinano la completa inattivazione delle SFK *in vivo* (39).

Come descritto precedentemente, CD45 è responsabile della defosforilazione di  $pY_T$  e quindi dell'attivazione di SFK. Paradossalmente, esistono evidenze sperimentali che ammettono un suo coinvolgimento come regolatore negativo di SFK mediante defosforilazione di  $pY_A$ . In cellule T che non esprimono CD45, i livelli di fosforilazione delle tirosine regolatorie di Lck sono elevati a sostegno dell'ipotesi che CD45 poteva essere in grado di defosforilare entrambi i siti. Infatti, l'analisi dello stato di fosforilazione della  $pY_A$  del mutante Lck Y505F, espresso in timociti in assenza e in presenza di CD45, ha determinato che in cellule T

esprimenti CD45 i livelli di pY<sub>A</sub> risultavano più bassi confermando così la capacità della fosfatasi di defosforilare pY<sub>A</sub> *in vivo* (40).

Anche SHP-1, prima citata, è in grado di defosforilare pY<sub>A</sub> ed inattivare SFK. La defosforilazione di pY<sub>A</sub> di Lck è stata dimostrata prima *in vitro* e successivamente *in vivo* in cellule HEK293T trasfettate (41).

La diversa capacità di CD45 e SHP-1 di defosforilare alternativamente le due tirosine regolatorie di SFK si suppone venga regolata dall'input di segnale, dal tipo di cellula ma anche dalla localizzazione sub-cellulare (38).

#### **Inibitori endogeni catalitici: tirosin-chinasi che fosforilano Y<sub>T</sub> di SFK.**

Le tirosin-chinasi in grado di inibire l'attività di SFK mediante la fosforilazione di Y<sub>T</sub> sono Csk ed il suo omologo Chk. Strutturalmente simili alle SFK, mancano del sito di acilazione nella regione N-terminale, del sito di autofosforilazione nel dominio catalitico e della tirosina inibitoria nel segmento C-terminale (15). Mentre Csk è ubiquitariamente espressa, Chk si trova quasi esclusivamente in cellule neuronali e di origine ematopoietica. Queste tirosin-chinasi sono localizzate principalmente nel citosol. Poiché SFK sono ancorate alle membrane, l'azione di inibizione di Csk e Chk sarà legata alla loro capacità di traslocare alle stesse interagendo con proteine di membrana o con adattatori mediante i loro domini regolatori SH3, SH2 e catalitico. Ne è un esempio l'adattatore Csk-binding protein (Cbp) denominato PAG prima citato. Nel cervello, in fibroblasti e nei linfociti T, Cbp co-localizza a livello della membrana plasmatica con SFK nei "lipid rafts". Quando attivate, SFK fosforilano Cbp in residui di tirosina che offrono al dominio SH2 di Csk dei siti di docking per il suo reclutamento alla membrana. L'interazione mediata dal dominio SH2 permette a Csk di attivarsi e di fosforilare SFK inattivandole. Oltre a Cbp, Csk può essere reclutato alla membrana per interazione con siti tirosinici fosforilati di caveolina-1 e paxillina, ad esempio. Anche Chk viene reclutato con lo stesso meccanismo di Csk alla membrana, ma con partners differenti quali ErbB2, c-Kit (15).

**Inibitori endogeni non catalitici: Chk, WASP e caveolina.** I dati riportati in letteratura evidenziano come gli inibitori catalitici prima descritti non siano in grado di inibire tutte le forme attive di SFK potenzialmente presenti *in vivo*. Ad esempio, la mancata defosforilazione di pY<sub>T</sub> non permette a Csk di inibire le SFK attivate mediante ligandi per il dominio SH3 o SH2. L'inibizione di tutte le forme

di SFK è stato dimostrata essere mediata da inibitori non catalitici, la cui funzione è quella di inibire l'attività tirosin-chinasica Src-dipendente mediante la sola interazione con la chinasi (15).

Chk, come precedentemente citato, inibisce l'attività di molti membri della famiglia Src (inclusi c-Src, Lyn, Lck e Fyn) mediante fosforilazione di  $Y_T$  (42,43). Di recente è stato dimostrato che Chk può inibire SFK *in vitro* ed in cellule mediante un meccanismo non catalitico che non coinvolge la fosforilazione di  $Y_T$  (44). Chk lega direttamente le conformazioni attive di SFK formando complessi stabili la cui costituzione è indipendente dall'ATP o nel caso in cui la tirosina inibitoria di Hck sia mutata in Phe. La formazione del complesso è così sufficiente per inibire l'attività e l'autofosforilazione di SFK (45). L'importanza fisiologica di questa scoperta consiste nella versatilità di Chk quale inibitore endogeno in grado di inattivare qualsiasi forma attiva di SFK, anche quando la tirosina inibitoria è fosforilata.

Altro esempio di meccanismo inibitorio non catalitico è rappresentato da WASP. Questo è un'effettore di cdc42, una GTPase della famiglia Rho, coinvolto nella regolazione dell'actina citoscheletrica. L'interazione tra c-Src e WASP è mediata dal dominio SH3 di c-Src ed il motivo PXXP di WASP. Inoltre c-Src interagisce anche con un motivo inibitorio presente nell'adattatore. La formazione di questo complesso è sufficiente all'inibizione della chinasi ed alla mancata disorganizzazione citoscheletrica compatibile con un'attività Src-dipendente (38,46).

L'inibizione di SFK è transiente in natura, perché dopo dissociazione dall'inibitore le chinasi possono riconvertirsi in una forma attiva. La cooperazione di entrambi gli inibitori endogeni, catalitici e non, è essenziale per la completa inattivazione di SFK. Infatti si pensa che l'istantanea inibizione mediata dagli inibitori non catalitici prevenga l'autofosforilazione di SFK, mentre la defosforilazione di  $pY_A$  grazie alle fosfatasi e la fosforilazione di  $Y_T$  da parte di Csk e Chk converta SFK nella conformazione chiusa ed inattiva (38).

**Inibitori endogeni non catalitici: ubiquitinazione e degradazione mediata dal proteasoma.** E' stato ampiamente dimostrato che le forme attivate delle tirosin-chinasi Src sono il bersaglio di un meccanismo di down-regolazione irreversibile mediato dal sistema ubiquitina-proteosoma. Questo si riflette in una diminuzione della quantità proteica della chinasi e conseguente calo dell'attività ca-

talitica potenzialmente presente nella cellule. L'ubiquitinazione è una modificazione post-traduzionale delle proteine necessaria al riconoscimento ed alla successiva degradazione da parte del proteasoma. Essa è mediata da una famiglia di E3s ligasi, in cui si identifica il sottogruppo Cbl. I membri appartenenti a quest'ultima sono ubiquitariamente espressi e sono localizzati a livello del citosol. Strutturalmente sono definiti come degli adattatori proteici multivalenti in quanto presentano un'ampia varietà di domini di interazione, tra cui uno che lega tirosin-chinasi (TKB) ed una regione ricca in prolina. Inoltre, Cbl è descritto come substrato SFK in quanto la sua fosforilazione media la sua traslocazione alla membrana plasmatica ed interazione con SFK. Dopo stimolo, la formazione del complesso Cbl-SFK è mediata dai domini SH3, SH2 delle chinasi ma anche dalla tirosina attivatoria fosforilata nel loop di attivazione: è dimostrato infatti che Cbl può legare mediante il suo dominio TKB la pY<sub>A</sub> in c-Src. Poiché la famiglia Cbl è essenziale per il controllo di numerosi processi fisiologici, è utile ritenere che una sua deregolazione possa essere coinvolta nello sviluppo di numerose malattie tra le quali le neoplasie, causate da una de-regolazione dell'attività chinasica Src in seguito alla mancata degradazione delle forme attivate di questi enzimi (46).

#### **Inibitori sintetici dell'attività SFK.**

Come sino a qui descritto, le SFK sono implicate nella trasduzione del segnale mediata da recettori e si caratterizzano strutturalmente per la presenza di domini coinvolti nella modulazione della loro attività mediante localizzazione sub-cellulare (SH4), l'interazione con ligandi (SH3, SH2) e l'attività enzimatica. Ciascun dominio rappresenta un possibile target di inibizione dell'attività delle tirosin-chinasi Src.

L'innata o acquisita deregolazione dell'attività protein-chinasica è stato dimostrato essere implicata nella patogenesi di numerose malattie, incluso il cancro. L'inibizione quindi delle chinasi coinvolte è stata proposta come promettente trattamento farmacologico nella cura dei pazienti affetti da queste patologie. Tra le chinasi studiate come possibili targets sono annoverate anche le SFK.

La funzionalità delle tirosin-chinasi Src può essere quindi influenzata od inibita mediante l'uso di agenti farmacologici in grado di interagire con i domini od inducendo modificazioni covalenti che possano alterare artificialmente l'attività o la localizzazione sub-cellulare delle chinasi stesse. A questo scopo si stanno stu-

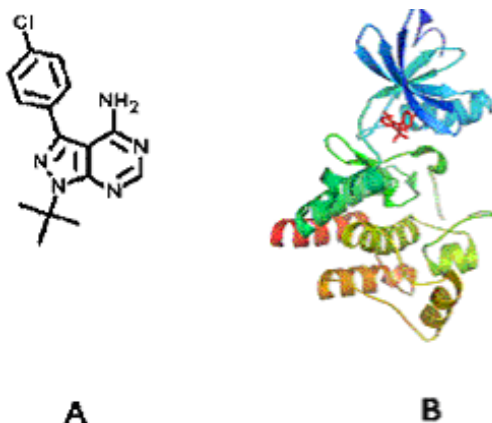
diando: (i) inibitori diretti del dominio catalitico; (ii) inibitori diretti ai domini SH3 e SH2; (iii) inibitori dell'acilazione.

Affinché una molecola sia utilizzata come inibitore/modulatore dell'attività Src deve presentare alcuni requisiti: (i) piccole dimensioni, (ii) permeabilità cellulare, (iii) elevata specificità o selettività, (iv) sufficiente potenza da poter competere con l'eccesso di ligandi endogeni. La specificità degli inibitori deriva dal fatto che i membri appartenenti ad una stessa famiglia presentano un elevato grado di omologia di sequenza (per i membri della famiglia Src 70-80%) mentre si riduce al 20% per i membri delle diverse famiglie (47).

#### **Inibitori dell'attività catalitica.**

Il lobo N-terminale del dominio catalitico è un'importante bersaglio per la costruzione di inibitori Src in grado di esercitare un meccanismo competitivo nei confronti dell'ATP. Molti dei composti attivi, naturali o di sintesi, presentano due anelli aromatici od etero-aromatici che favoriscono in un sistema di interazioni idrofobiche col sito di binding dell'ATP delle chinasi.

I primi potenti inibitori di SFK sintetizzati e riportati in letteratura sono state le Pirazolo[3,4-*d*]pirimidine PP1e PP2 (classe chimica 1-*t*-butil-4-aminopirazolo[3,4-*d*]pirimidine) (48,49). Studi cristallografici eseguiti successivamente dimostrarono che PP1 e PP2 si legavano in SFK nella fessura tra i lobi N- e C-terminali del dominio catalitico normalmente occupata dall'ATP (50,51). L'anello pirazolpirimidinico instaura dei legami idrogeno con il gruppo carbonilico della Glu317 ed con il gruppo amidico della Met310, simili a quelli presenti nell'interazione tra l'anello adeninico degli analoghi dell'ATP con il medesimo target (Figura, 4).



**Figura 4. (A) Struttura di PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-*d*]pyrimidine); (B) Cristallo della forma attiva di Lck che interagisce con PP2.**

La selettività di questi inibitori è dovuta alla presenza delle catene laterali metilfenilica e clorofenilica che si inseriscono nella tasca idrofobica adiacente al sito di legame per l'ATP. Tra l'altro questo sito non viene normalmente occupato dal nucleotide (49).

Sebbene la presenza di questo pocket idrofobico non sia esclusiva delle SFK, la sua topologia varia tra le diverse famiglie delle chinasi e l'accesso alla tasca è regolato dall'ingombro sterico delle catene laterali degli aminoacidi che lo costituiscono. Nelle SFK un residuo di Thr (Thr338 per Hck o Thr316 per Lck) consente l'accesso alla tasca. Residui più ingombranti presenti nella stessa posizione ma in altre chinasi, come una Met in Zap-70, restringono l'area di accesso rendendo l'enzima insensibile all'inibizione di PP1 e PP2 (47). A conferma di quest'ipotesi, Liu *et al.* dimostrarono che mutando al Thr338 di v-Src in Ile si riduceva la sensibilità della chinasi a PP1, e che l'uso di catene laterali ancora più ingombranti tipo quelle della metionina o di una fenilalanina incrementavano fortemente l'insensibilità all'inibizione. Per contro la sostituzione della treonina con alanina o glicina rendeva la chinasi ancora più suscettibile all'inibizione.

La presenza della Thr in quella posizione non è ristretta alle sole SFK: infatti è conservata anche PDGF-R (Platelet-derived growth factor receptor) e nella tirosin-chinasi Abl, i quali esibiscono una certa sensibilità all'inibizione da parte di PP1 e PP2 (49).

L'analisi della strutture di PP1 legato ad Hck in conformazione inattiva e PP2 legato invece a Lck in conformazione attiva ha rivelato che lo spazio della regione idrofobica varia in funzione dello stato di attivazione della chinasi. Infatti in Hck questo risulta più largo come conseguenza dell'adozione da parte dell' $\alpha$ -elica C di un'orientazione inibitoria. L'allargamento della tasca idrofobica potrebbe essere così impiegato nello studio di molecole che stabilizzano SFK nel loro stato inattivo. A questo proposito la sostituzione in PP1 del gruppo metile con uno fenossi-fenilico ha permesso di incrementare la specificità inibitoria nei confronti di Lck in conformazione inattiva (49-51).

La ricerca di nuove molecole con attività inibitoria su SFK ma non su PDGFR ha portato allo sviluppo dell'indolinone SU6656 (52). Questo si è dimostrato estremamente potente nell'inibizione di c-Src, Fyn, Yes, Lyn e Lck, ma inefficiente su PDGF-R. Alla luce di questi risultati, si può ragionevolmente assumere che pro-

cessi o vie di segnale inibite sia dall'uso di PP1 e PP2 che di SU6656 dipendano dall'attività di una tirosin-chinasi Src (53).

### **Inibitori del dominio SH2.**

L'interazione del dominio SH2 di SFK è mediata dal riconoscimento di una specifica sequenza consenso a valle della tirosina fosforilata situata nella sequenza consenso pYEEI.

L'analisi delle strutture tridimensionali di SFK ha dimostrato che il dominio SH2 presenta due zone di binding: una idrofilica occupata dalla fosfotirosina ed una idrofobica occupata dal residuo di Ile in pY+3. Di norma il dominio SH2 è utilizzato da SFK per l'interazione con i substrati o la localizzazione sub-cellulare. I repentini cambiamenti a cui le tirosin-chinasi Src sono sottoposte durante la trasduzione del segnale rendono l'interazione mediata dal dominio SH2 un legame a bassa affinità. Di fatto piccoli peptidi (lunghi 5/6 aminoacidi) contenenti tirosine fosforilate si sono dimostrati in grado di competere con ligandi proteici per l'interazione con SH2. La difficoltà nella progettazione e sintesi di nuovi inibitori si trova nella carica negativa altamente concentrata del ligando (vedi il gruppo fosfato e le catene laterali degli aminoacidi acidi) che da una parte impedisce ai composti di attraversare le membrane cellulari e, dall'altra, causa instabilità del ligando che può essere attaccato da fosfatasi e proteasi. In generale la sostituzione della carica negativa o la modificazione dei legami con l'ossigeno della fosfotirosina (che conferirebbe resistenza alle fosfatasi) causano una drammatica diminuzione dell'affinità del ligando per SH2 (49).

Razionalmente si sono costruiti degli inibitori che presentano tre componenti: un mimetico della pY, un adattatore centrale ed una componente idrofobica (54).

Il mimetico per la pY può contenere fosfonati, fosfinati oppure uno o più gruppi carbossilici che lo rendono insensibile alle fosfatasi. Per diminuire la natura anionica dei residui, questi possono essere mascherati mediante la formazione di esteri che rendendo la molecola permeabile alle membrane. La componente idrofobica in sostituzione della Ile è caratterizzata dalla presenza di cicloesili o gruppi difenilici. Studi cristallografici hanno dimostrato che la porzione centrale ha un ruolo determinante nella corretta direzionalità del mimetico pY e dell'idrofobico nei rispettivi siti di interazione con il dominio SH2. E' stato dimostrato che il residuo in posizione +1 interagisce con l'anello fenolico della Tyr $\beta$ D5, che costituisce una

superficie idrofobica, instaurando dei legami tipo van der Waals che permettono al ligando di estendersi ed adattarsi ai siti di docking. L'adattatore ideale dovrebbe quindi avere una struttura rigida e la capacità di formare legami ad idrogeno ed interazioni idrofobiche con l'anello aromatico della tirosina prima citata. Esempi sono le benzamidi (mono- e bicicliche-) e i caprolattami. Paradossalmente, la ricerca di inibitori ad alta affinità per il dominio SH2 potrebbe comportare la sintesi di molecole che attivano le SFK. Gli studi si stanno rivolgendo alla costituzione di inibitori bivalenti che possano cioè interagire sia con il dominio SH2 che con il dominio catalitico (54,55).

### **Inibitori del dominio SH3.**

Il dominio SH3 di SFK riconosce preferenzialmente sequenze ricche in prolina tipo PXXP. Come già citato precedentemente, le interazioni tra il dominio ed i ligandi risultano a bassa affinità. Al fine di aumentare l'affinità dei peptidi competitori si sono introdotti dei sostituenti non naturali. La sostituzione di una prolina nella sequenza consenso con una N-alchil-glicina ha generato dei ligandi che esibiscono un'altissima affinità per il partner di interazione (55).

### **Inibitori dell'acilazione.**

L'appropriata localizzazione sub-cellulare è fondamentale per il corretto funzionamento delle tirosin-chinasi Src. Di queste, la maggior parte è sia miristoilata che palmitoilata a livello del dominio SH4. Un approccio per modulare le funzionalità Src prevede l'uso di inibitori o substrati alternativi per gli enzimi deputati ai processi di miristoilazione e palmitoilazione. La N-miristoilazione è catalizzata da N-miristoiltransferasi (NMT) che ha come substrato il miristoil-CoA. L'inibitore più comunemente usato per inibire questo processo è l'acido-2-idrossimiristico (HMA), che viene assorbito dalla cellula e convertito dall'acil-CoA sintetasi cellulare a 2-idrossimiristoil-CoA, un potente inibitore dell'NMT (49). L'uso di HMA in cellule monocitiche determina mancata miristoilazione di Lyn che non localizza così nei "lipid rafts" determinando mancata fosforilazione di FcγRII (56). HMA è un inibitore selettivo della miristoilazione, quindi un approccio alternativo deve essere usato per bloccare la S-palmitoilazione. A questo scopo si utilizza il 2-bromopalmitato che inibisce l'acilazione proteica in generale, con un impatto maggiore sulla palmitoilazione (57). Dopo trattamento, la palmitoilazione di Fyn è ridotta del 90%, mentre la miristoilazione del 70%.

Una strategia alternativa per modulare l'attività delle Src è usare un substrato alternativo per l'aciltransferasi piuttosto che un inibitore. L'incorporazione di acidi grassi di lunghezza paragonabile a quella dell'acido miristico, ma con catene le cui proprietà sono modificate, possono alterare le proprietà delle proteine acilate. L'enzima NMT accetterà come substrati un'ampia varietà di analoghi di acidi grassi, purché siano simili all'acido miristico in lunghezza (58).

# ***Obiettivi Generali***



## **OBIETTIVI GENERALI.**

Le SFK svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare tanto che perturbazioni dei loro meccanismi di regolazione sono alla base di molteplici patologie, incluso il cancro.

Durante il mio dottorato ho focalizzato i miei studi da un lato sui meccanismi di regolazione/deregolazione delle SFK in due patologie tumorali quali la Leucemia linfatica Cronica di tipo B e i Disordini Mieloproliferativi, dall'altro sulle vie di trasduzione del segnale mediate da SFK in cellule muscolari murine C2C12 durante il differenziamento.

I risultati ottenuti sono di seguito riportati.



## ***Materiali e Metodi***



## 1.MATERIALI

### 1.1 Prodotti generali

[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP è acquistato da Amersham Bioscience (NJ, USA). Gli inibitori PP2 (4-amino-5(4chlorophenyl)7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine), SU6656 (2-oxo-3-(4,5,6,7-tetrahydro-1 *H*-indol-2-ylmethylene)-2,3-dihydro-1*H*-indole-5-sulfonic acid dimethylamide) AG490 e calpeptina sono pervenuti da Calbiochem (Darmstadt, Germany). Dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) sono stati acquistati : Geldanamicina (GA), 17-AAG [17-(allylamino)-17-demethoxy-geldanamicina], lactacistina, polimero polyGlu<sub>4</sub>Tyr,  $\lambda$ PPase, and phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2. Gli inibitori di proteasi provengono dalla Boehringer (Mannheim, Germany).

Il peptide Src-specifico cdc2(6-20) è stato purificato dal Prof. O. Marin, Università di Padova.

### 1.2 Anticorpi comuni.

L'anticorpo monoclonale anti-fosfotirosina (PY-20), denominato in questa tesi come anti-pY, è ottenuto dalla Transduction Laboratories (Lexington, KY). L'anti-pSrc (Y416), che corrisponde anche all'anticorpo anti-pLyn (Y396), qui denominato pY<sub>A</sub>, è acquistato dalla Cell Signaling. L'anticorpo anti- $\beta$ actina (clone AC-15) deriva dalla Sigma-Aldrich(St. Louis, MO).

### 1.3 Anticorpi utilizzati nello studio della leucemia linfatica cronica di tipo B.

Gli anticorpi anti-IgM-FITC e anti-IgD-FITC derivano dalla DakoCytomation (Glostrup, Denmark). Anti-pLyn (Y507) (pY<sub>T</sub>), anti-Akt, e l'anticorpo policlonale anti-PARP sono acquistati dalla Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Anti-Lyn, anti-SHP-1, un anticorpo policlonale che riconosce una sequenza di 19 aminoacidi a livello della coda C-terminale di SHP-1, anti-SHP-2 and Hsp90  $\alpha/\beta$  provengono da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'anticorpo policlonale anti-HS1, prodotto contro la forma ricombinate della proteina umana di HS1 utilizzato per le immunoprecipitazioni, è stato da noi purificato (59). Gli anticorpi monoclonali CD3-FITC, CD19-FITC, CD5-PE, CD16-PE, CD23-PE, CD38-PE and CD79b-PE, l'anticorpo anti-HS1 monoclonale usato per Western blotting

e l'anticorpo monoclonale anti-SHP-1/1L, sono purificati dalla BD Biosciences (San Diego, CA). L'anti-Cbl è ottenuto dalla Chemicon International (Temecula, CA). L'anticorpo anti-STAT3 e l'anti-ZAP-70 monoclonale sono acquistati da Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

#### **1.4 Anticorpi utilizzati nello studio dei disordini mieloproliferativi.**

Gli anticorpi anti-pJAK2, anti-JAK2, anti-pSTAT5 e l'anticorpo anti-STAT5 sono acquistati da Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). L'anticorpo anti-pSrc(Y527), denominato in questa tesi come pY, proviene da Cell Signaling. L'anticorpo anti-Src è ottenuto da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

#### **1.5 Anticorpi utilizzati nello studio del differenziamento muscolare.**

L'anticorpo monoclonale anti-Grp94 3C4, utilizzato per gli esperimenti di immunoprecipitazione, è ottenuto dopo immunizzazione con un peptide ricombinante come descritto in (60). L'anticorpo monoclonale anti-Grp94 (clone 9G10) usato per gli esperimenti di immunofluorescenza, l'anticorpo anti-Grp94 policlonale reattivo contro la frazione C-terminale (utilizzato per Western Blot ed analisi immunogold) e l'anticorpo anti-calreticulina è acquistato dalla Stressgen (S. Diego, CA). Gli anticorpi anti-Fyn, anti calnexina, anti-MHC e delle immunoglobuline di topo non immuni sono ottenute da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'anticorpo monoclonale anti-GM130 ed anti-Fyn usati per l'analisi di fluorescenza e immunogold sono pervenuti da BD Biosciences (San Diego, CA). L'anticorpo anti-PMCA ed anti-Complex II sono ottenuti da Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) e Molecular Probes (Eugene, OR), rispettivamente. L'anti-rabbit IgG gold (15 nm) ed anti-mouse IgG gold (10nm) sono pervenuti da Sigma-Aldrich(St. Louis, MO). L'anti-rat IgG TRITC e l'anti-mouse IgG FITC sono acquistati dalla Sigma e da Santa Cruz Biotechnology.

#### **1.6 Caratteristiche dei pazienti affetti da leucemia linfatica cronica di tipo B.**

In questo studio sono stati presi in esame 40 pazienti affetti da B-LLC di età compresa tra i 45 e 85 anni, mai sottoposti ad alcun tipo di terapia. I pazienti sono classificati secondo metodo Rai (61).

Il numero totale di leucociti (WBC) dei pazienti presi in esame varia tra i  $19 \times 10^9/L$  e  $322 \times 10^9/L$ . Altre caratteristiche dei pazienti B-LLC sono specificate in tabella I.

### **1.7 Caratteristiche dei pazienti affetti da disordini mieloproliferativi.**

In questo studio sono stati presi in esame 40 pazienti, 30 affetti da trombocitemia essenziale e 10 affetti da policitemia vera, di età compresa tra i 36 e 85 anni, mai sottoposti ad alcun tipo di terapia.

Il numero totale delle piastrine dei pazienti presi in esame è stabilmente al di sopra dei  $500 \times 10^9/L$ . Altre caratteristiche dei pazienti DMP sono specificate in tabella II. La caratterizzazione clinica e l'identificazione delle mutazioni presenti in JAK2 sono state condotte nel laboratorio del Prof. Fabris.

## **2. METODI.**

### **2.1 Metodiche comuni utilizzate nei differenti studi.**

Di seguito vengono riportate le metodiche comuni utilizzate nei differenti studi presentati in questa tesi.

**Lisati cellulari e frazionamento sub-cellulare.** Per ottenere lisati totali, i campioni (il numero di cellule utilizzato è specifico per ogni studio ed è indicato nelle didascalie delle figure corrispondenti) sono rapidamente lisati in Tampone A (62 mM Tris/HCl, pH 6.8, contenente 5% glicerolo, 0.5% SDS e 0.5%  $\beta$ -mercaptoetanolo).

Per ottenere le frazioni sub-cellulari, i campioni (il numero di cellule utilizzato è specifico per ogni studio ed è indicato nelle didascalie delle figure corrispondenti) sono sonicati in 350  $\mu$ l di Tampone isotonic B (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.25 M saccarosio, 1 mM sodio ortovanadato, e inibitori di proteasi). L'omogenato cellulare è quindi centrifugato a 10,000g per 10 min. per separare la frazione particolata contenente cellule non rotte, nuclei e altri organelli sub-cellulari. Il sopranatante è quindi centrifugato a 105,000g per 1h al fine di separare la frazione microsomiale da quella citosolica. La concentrazione delle proteine è determinata mediante metodo Bradford.

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti affetti da B-LLC.

| Pazienti | Età | Sesso | Stadio Rai <sup>A</sup> | Conta Wbc (/mm <sup>3</sup> ) | Linfociti (%) | Mutazione di V <sub>H</sub> | Espressione di ZAP70 | %CD19/5 | %CD38 | %CD79b |
|----------|-----|-------|-------------------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|----------------------|---------|-------|--------|
| 1        | 51  | M     | 0                       | 33,300                        | 87.1          | Mutato                      | NEG                  | 89      | 92    | 76     |
| 2        | 64  | F     | 0                       | 49,600                        | 83.6          | Mutato                      | POS                  | 88      | 42    | 100    |
| 3        | 46  | F     | 0                       | 25,000                        | 74.4          | Mutato                      | NEG                  | 86      | 43    | 72     |
| 4        | 58  | F     | 0                       | 37,500                        | 84.0          | Non Mutato                  | POS                  | 83      | 34    | 100    |
| 5        | 67  | M     | 0                       | 18,600                        | 82.8          | Mutato                      | ND                   | 70      | NEG   | 84     |
| 6        | 64  | F     | I                       | 68,900                        | 85.5          | Mutato                      | NEG                  | 97      | NEG   | 63     |
| 7        | 72  | F     | I                       | 16,600                        | 92.4          | Mutato                      | NEG                  | 85      | NEG   | 5      |
| 8        | 68  | M     | I                       | 29,600                        | 81.2          | Mutato                      | POS                  | 71      | 83    | 85     |
| 9        | 44  | F     | I                       | 50,200                        | 89.5          | Mutato                      | NEG                  | 95      | NEG   | 83     |
| 10       | 70  | F     | I                       | 15,200                        | 76.3          | Mutato                      | POS                  | 90      | NEG   | 95     |
| 11       | 74  | M     | I                       | 17,700                        | 68.6          | Non Mutato                  | POS                  | 86      | 63    | 57     |
| 12       | 75  | F     | I                       | 14,200                        | 60.0          | Non Mutato                  | POS                  | 85      | NEG   | 97     |
| 13       | 63  | M     | I                       | 28,800                        | 84.0          | ND                          | NEG                  | 85      | NEG   | 90     |
| 14       | 56  | M     | I                       | 77,000                        | 82.5          | Mutato                      | NEG                  | 89      | 71    | 100    |
| 15       | 49  | F     | I                       | 37,200                        | 83.4          | Non Mutato                  | POS                  | 93      | NEG   | 63     |
| 16       | 60  | M     | I                       | 11,500                        | 77.6          | Mutato                      | NEG                  | 81      | NEG   | 68     |
| 17       | 69  | M     | I                       | 18,500                        | 81.5          | Non Mutato                  | POS                  | 86      | 61    | 99     |
| 18       | 74  | M     | II                      | 28,000                        | 85.0          | Mutato                      | NEG                  | 95      | NEG   | 97     |
| 19       | 59  | M     | II                      | 156,200                       | 75.9          | ND                          | NEG                  | 76      | NEG   | 59     |
| 20       | 65  | M     | II                      | 27,680                        | 79.7          | Mutato                      | NEG                  | 87      | 55    | 71     |
| 21       | 65  | M     | II                      | 142,000                       | 80.2          | Non Mutato                  | ND                   | 94      | NEG   | 23     |
| 22       | 63  | M     | II                      | 33,000                        | 85.1          | Non Mutato                  | POS                  | 86      | NEG   | 87     |
| 23       | 66  | M     | III                     | 29,700                        | 88.6          | Mutato                      | NEG                  | 91      | 56    | 93     |
| 24       | 60  | M     | III                     | 39,400                        | 74.0          | Non Mutato                  | POS                  | 90      | 52    | 83     |
| 25       | 60  | M     | III                     | 73,640                        | 88.7          | Mutato                      | NEG                  | 95      | NEG   | 94     |
| 26       | 60  | M     | III                     | 33,500                        | 79.5          | Mutato                      | POS                  | 89      | NEG   | 20     |
| 27       | 68  | M     | III                     | 128,800                       | 96.4          | Non Mutato                  | POS                  | 96      | POS   | NEG    |
| 28       | 84  | M     | IV                      | 160,500                       | 76.1          | Non Mutato                  | POS                  | 98      | NEG   | 35     |
| 29       | 80  | F     | IV                      | 27,300                        | 84.6          | Mutato                      | POS                  | 89      | NEG   | 47     |
| 30       | 77  | F     | IV                      | 46,700                        | 88.8          | Mutato                      | NEG                  | 95      | NEG   | 96     |
| 31       | 77  | M     | IV                      | 120,600                       | 79.1          | Non Mutato                  | POS                  | 88      | 91    | 94     |
| 32       | 74  | F     | IV                      | 31,700                        | 85.6          | Non Mutato                  | POS                  | 90      | 39    | 74     |
| 33       | 85  | M     | IV                      | 36,800                        | 91.6          | Mutato                      | NEG                  | 93      | NEG   | 89     |
| 34       | 63  | M     | IV                      | 106,100                       | 85.6          | Mutato                      | NEG                  | 97      | NEG   | 70     |
| 35       | 80  | M     | IV                      | 41,300                        | 87.8          | Non Mutato                  | POS                  | 91      | 59    | 83     |
| 36       | 82  | M     | IV                      | 150,800                       | 76.0          | Mutato                      | NEG                  | 95      | 100   | 89     |
| 37       | 58  | M     | IV                      | 32,800                        | 89.0          | ND                          | NEG                  | 96      | NEG   | 92     |
| 38       | 60  | M     | IV                      | 87,600                        | 94.4          | Non Mutato                  | POS                  | 87      | NEG   | 67     |
| 39       | 53  | F     | IV                      | 21,700                        | 81.6          | Non Mutato                  | POS                  | 84      | 81    | 29     |
| 40       | 64  | M     | IV                      | 51,700                        | 82.1          | Mutato                      | ND                   | 95      | NEG   | 54     |

<sup>A</sup>Stadio diagnosticato mediante metodo K.R. Rai (61). <sup>B</sup>“Mutato” si definisce quando la sequenza V<sub>H</sub> presenta una frequenza di mutazione superior al 2% rispetto al centro germinativo V<sub>H</sub> sequence. E' determinato mediante analisi Western rispetto a cellule B normali purificate al 98%. ND, non determinata; NEG, negativo; POS, positivo

**Tabella 2.** Caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti affetti da DMP.

| Pazienti | Età | Sesso | Diagnosi <sup>A</sup> | Conta Wbc (/mm <sup>3</sup> ) | Conta piastrinica (x10 <sup>9</sup> /L) | HB gr/dl | HT%  | Stato Mutazione JAK2 | OMO- /ETEROZIG OSI <sup>B</sup> | SUBSET |
|----------|-----|-------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|----------|------|----------------------|---------------------------------|--------|
| 1        | 36  | F     | TE                    | 51,900                        | 489                                     | 14,6     | 45,4 | JAK2V617F            | ETERO                           | A      |
| 2        | 84  | F     | TE                    | 62,000                        | 703                                     | 9,3      | 28,5 | WT                   |                                 | B      |
| 3        | 69  | F     | TE                    | 34,400                        | 798                                     | 12,6     | 38,9 | WT                   |                                 | A      |
| 4        | 73  | M     | TE                    | 119,500                       | 949                                     | 13,3     | 39,3 | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 5        | 48  | F     | TE                    | 63,000                        | 541                                     | 13,5     | 40,3 | JAK2V617F            | ETERO                           | B      |
| 6        | 71  | F     | TE                    | 54,000                        | 646                                     | 13,5     | 40,7 | WT                   |                                 | A      |
| 7        | 39  | F     | TE                    | 130,000                       | 603                                     | 11,8     | 37,1 | JAK2V617F            |                                 | A      |
| 8        | 75  | F     | TE                    | 120,000                       | 926                                     | 12,6     | 37   | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 9        | 36  | M     | TE                    | 94,800                        | 696                                     | 12,5     | 34   | WT                   |                                 | B      |
| 10       | 80  | F     | TE                    | 110,600                       | 945                                     | 15,4     | 49,9 | JAK2V617F            | ETERO                           | B      |
| 11       | 80  | M     | TE                    | 81,00                         | 549                                     | 12,6     | 37,2 | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 12       | 74  | M     | TE                    | 91,300                        | 1021                                    | 13,5     | 42,6 | JAK2V617F            | ETERO                           | B      |
| 13       | 47  | F     | TE                    | 79,700                        | 594                                     | 13,1     | 42,2 | WT                   |                                 | B      |
| 14       | 63  | F     | TE                    | 64,000                        | 566                                     | 13,5     | 38   | JAK2V617F            | ETERO                           | A      |
| 15       | 77  | F     | TE                    | 56,000                        | 593                                     | 13,3     | 41,7 | WT                   |                                 | B      |
| 16       | 70  | F     | TE                    | 48,000                        | 537                                     | 12,3     | 36,4 | WT                   |                                 | B      |
| 17       | 57  | F     | TE                    | 63,000                        | 740                                     | 13,8     | 47,4 | WT                   |                                 | A      |
| 18       | 45  | F     | TE                    | 72,000                        | 741                                     | 14,4     | 43,4 | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 19       | 76  | M     | TE                    | 89,000                        | 569                                     | 14,9     | 43,7 | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 20       | 33  | F     | TE                    | 40,000                        | 619                                     | 13,3     | 40,8 | JAK2V617F            | ETERO                           | A      |
| 21       | 74  | F     | TE                    | 58,000                        | 854                                     | 14       | 41,3 | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 22       | 40  | F     | TE                    | 61,000                        | 571                                     | 13,6     | 40   | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 23       | 39  | F     | TE                    | 104,900                       | 1130                                    | 13       | 41,2 | JAK2V617F            | ETERO                           | B      |
| 24       | 70  | F     | TE                    | 71,600                        | 1016                                    | 12,9     | 38,4 | WT                   |                                 | B      |
| 25       | 70  | F     | TE                    | 70,000                        | 715                                     | 14       | 45   | WT                   |                                 | A      |
| 26       | 70  | F     | TE                    | 70,000                        | 733                                     | 14       | 42   | WT                   |                                 | B      |
| 27       | 84  | M     | TE                    | 718,000                       | 603                                     | 15       | 47   | JAK2V617F            | ETERO                           | A      |
| 28       | 71  | F     | TE                    | 874,000                       | 642                                     | 13       | 39   | JAK2V617F            |                                 | B      |
| 29       | 64  | F     | TE                    | 916,000                       | 755                                     | 11       | 33   | WT                   |                                 | B      |
| 30       | 82  | M     | TE                    | 920,000                       | 954                                     | 8        | 26   | WT                   |                                 | A      |
| 31       | 79  | M     | PV                    | 76,000                        | 415                                     | 12,6     | 40   | JAK2V617F            |                                 |        |
| 32       | 67  | M     | PV                    | 203,300                       | 585                                     | 13,9     | 49   | JAK2V617F            | OMO                             |        |
| 33       | 85  | M     | PV                    | 145,400                       | 655                                     | 15,3     | 49,3 | JAK2V617F            | OMO                             |        |
| 34       | 66  | F     | PV                    | 79,000                        | 145                                     | 46,8     | 46,8 | JAK2V617F            |                                 |        |
| 35       | 77  | M     | PV                    | 71,000                        | 283                                     | 14,8     | 34,3 | JAK2V617F            |                                 |        |
| 36       | 72  | F     | PV                    | 67,000                        | 462                                     | 15,6     | 41,7 | JAK2V617F            | ETERO                           |        |
| 37       | 74  | F     | PV                    | 69,000                        | 458                                     | 13,4     | 46,7 | JAK2V617F            | ETERO                           |        |
| 38       | 80  | M     | PV                    | 180,600                       | 595                                     | 14       | 45   | JAK2V617F            | OMO                             |        |
| 39       | 66  | F     | PV                    | 125,700                       | 867                                     | 9,7      | 46,7 | JAK2V617F            | OMO                             |        |
| 40       | 62  | F     | PV                    | 130,000                       | 452                                     | 13,6     | 44,7 | JAK2V617F            | ETERO                           |        |

<sup>A</sup>Diagnosi Trombocitemia Essenziale (TE) e Policitemia Vera (PV). <sup>B</sup>Conzione di omo- ed eterozigosi per l'allele mutato JAK2V617F.

**Trattamento dei campioni con fosfatasi  $\lambda$ PPase.** 300  $\mu$ l di citosol ottenuto in Tampone B privo di 1 mM sodio ortovanadato, ed 300  $\mu$ l estratti delle frazioni microsomiali e dell'apparato del Golgi (quest'ultimo separato mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di Optiprep<sup>TM</sup> successivamente descritto), ottenuti dopo 1h di trattamento a 4°C con Tampone C (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10% glicerolo, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1mM sodio ortovanadato e inibitori di proteasi) privo di 1mM sodio ortovanadato, sono aggiunti di 60  $\mu$ l di 20 mM MnCl<sub>2</sub> e 60  $\mu$ l di tampone per  $\lambda$ PPase. Viene aggiunta quindi dell'acqua deionizzata fino ad un volume finale di 600  $\mu$ l. Il mix viene così suddiviso in due aliquote uguali ea a una delle due si aggiungono 300 unità di  $\lambda$ PPase. Dopo 45 min di incubazione, l'attività fosfataseica è bloccata mediante l'aggiunta di 1 mM sodio orto vanadato.

**Frazionamento mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di glicerolo.** 300  $\mu$ l di campione differentemente ottenuto (citosol per lo studio sulla leucemia linfatica cronica; estratti del ER e dell'apparato del Golgi per lo studio sul differenziamento muscolare) sono caricati su un gradiente di glicerolo (10-40%) di 3,9 ml costituito in 25 mM Hepes, pH 7,4, 1mM EDTA. I tubi sono centrifugati per 18h a 100,000g in un rotore SW60Ti (Beckman) a 4°C e successivamente frazionati in 18 frazioni dall'alto del gradiente, come riportato in (62). Glutammato deidrogenasi (62 kDa), alcool deidrogenasi (150 kDa), apoferritina (443 kDa) e tiro globulina (669 kDa) sono utilizzati come marker per determinare il peso molecolare dei complessi proteici in gradienti di riferimento.

**Western Blotting.** I campioni ottenuti nelle differenti condizioni sperimentali sono sottoposti a corsa elettroforetica al 10% in SDS/PAGE e quindi trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Dopo trattamento notturno a 4°C con una soluzione di siero albumina al 3%, le membrane sono incubate con gli appropriati anticorpi per 2 ore e, dopo lavaggio, con anticorpi coniugati a perossidasi per 1 ora. Le rivelazioni anticorpali sono ottenute mediante metodo ECL con acquisizione delle immagini per mezzo del Kodak Image Station 440CF ed elaborazione dei dati con Kodak 1D Image software (Rochester, NY). Le membrane, quando richiesto, possono essere ritratte con gli anticorpi primari dopo "stripping" con un Buffer D costituito da 0.1 M glicina (pH 2.5), 0.5 M NaCl, 0.1% Tween 20, 1%  $\beta$ -mercaptoetanolo e 0.1% NaN<sub>3</sub>.

**Saggio di attività tirosin-chinasica *in vitro*.** Le attività delle tirosin-chinasi studiate ottenute da differenti campioni sono saggiate in 30 µl di 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 µM [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (attività specifica 1000 cpm/pmol), 200 µM sodio ortovanadato, e 200 µM di peptide cdc2(6-20) o 1mg/ml del polimero random poli(Glu-Tyr)<sub>4:1</sub> come substrati esogeni. Dopo 10 minuti di incubazione a 30°C, la reazione è stoppata e i campioni sono sottoposti a SDS/PAGE. La radioattività incorporata è quantificata mediante Instant Imager Packard (Meriden, CT).

**Immunoprecipitazioni.** I campioni sono incubati per cinque ore a 4°C con gli appropriati anticorpi e gli immunocomplessi sono recuperati mediante incubazione per 1 ora con Proteina A-Sefarosio prima saturata con sieroalbumina. Gli immunoprecipitati sono lavati per tre volte con 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0.05% NP-40, 1 mM sodio ortovanadato, ed inibitori di fosfatasi e proteasi. Dopo SDS/PAGE, i campioni sono trasferiti su membrane di nitrocellulosa e rivelati con gli appropriati anticorpi.

## **2.2 Metodiche specifiche utilizzate per lo studio della leucemia linfatica cronica di tipo B.**

**Preparazione delle sospensioni cellulari.** Il sangue periferico dei pazienti affetti da LLC deriva da un prelievo venoso eparinato. I linfociti vengono isolati grazie ad un gradiente di densità Ficoll/Hypaque (F/H). A causa dell'elevato numero di linfociti caratteristico di tali patologie, il sangue viene diluito con soluzione fisiologica in rapporto di 1:3, ed agitato delicatamente. In seguito viene stratificato su un gradiente di F/H e centrifugato a 900g per 20 minuti, a 20°C senza freno.

A causa della bassa densità, le cellule mononucleate e le piastrine si concentrano in cima al gradiente di F/H, al contrario, i globuli rossi (RBC) e i granulociti si raccolgono sul fondo della provetta. Rimosso lo strato superiore le piastrine vengono separate dalle cellule mononucleate grazie a lavaggi successivi (2 lavaggi a 400g a temperatura ambiente). Le cellule mononucleate, così ottenute, vengono lavate tre volte con PBS, centrifugandole per 10 minuti a 400g, a 20°C con freno, e risospese in RPMI 1640.

Nella maggioranza di casi di LLC la percentuale di cellule B leucemiche è superiore all'85% dei PBMC (cellule mononucleate di sangue periferico). Nei casi in cui tale percentuale risultasse inferiore, si è proceduto alla purificazione dei linfociti B tramite rosettazione con globuli rossi di montone (SRBC) trattati con neuroaminidasi. La rosettazione permette di rimuovere i linfociti T dalle altre cellule mononucleate, utilizzando la loro peculiare capacità di legare e formare rosette con SRBC. Le rosette così ottenute sono state isolate tramite centrifugazione in gradiente di densità F/H.

La rosettazione prevede:

*Preparazione dei SRBC con neuroaminidasi.*

Da 15 a 25 ml di SRBC in terreno di trasporto vengono uniti a 25 ml di PBS e centrifugati per 10 minuti a 1000g, a 20°C. Rimosso il sopranatante, le cellule vengono risospese in 50 ml di PBS. Vengono effettuati due lavaggi con lo stesso procedimento. Il pellet ottenuto è stato trasferito in un tubo da centrifuga. Vengono aggiunti 5 ml di neuroaminidasi alla concentrazione 1 g/ml, portando a 50 ml con RPMI 1640. Segue un'incubazione di un'ora a 37°C. Al termine dell'incubazione vengono eseguiti 3 lavaggi con PBS a 1000g a temperatura ambiente. Al pellet dei SRBC trattati con neuroaminidasi (conc. finale 2% vol/vol), vengono aggiunti 49 ml di RPMI 1640 al 10% di FCS e sono stati lasciati a depositare.

*Formazione delle rosette.*

$2 \times 10^7$  cellule vengono trasferite in un tubo da centrifuga da 10 ml e centrifugate per 10 minuti a 400g, a 20°C. Eliminato il sopranatante le cellule vengono risospese in RPMI 1640 fino a raggiungere una concentrazione finale di  $2 \times 10^7$  cellule/ml.

Per il quantitativo di  $2 \times 10^7$  cellule viene aggiunto 1 ml di SRBC trattato con neuroaminidasi e risospeso in FCS. Segue un'incubazione di 15 minuti a 37°C, e una centrifugata a 4°C per 10 minuti a 200g senza freno ed, infine, un'incubazione per un'ora in ghiaccio. Dopo questa operazione sono stati aspirati 1.5 ml e aggiunti 2,5 ml di PBS. La miscela viene delicatamente risospesa e stratificata sopra la soluzione di F/H e centrifugata a 4°C per 20 minuti a 900g senza freno. Viene trasferito lo strato presente all'interfaccia, contenente in prevalenza cellule non-T (linfociti B, monociti, macrofagi), in una provetta da centrifuga da 10 ml ed effet-

tuati 2 lavaggi con PBS a 20°C per 10 minuti a 400g con freno. Le cellule, riospese in PBS, vengono contate per mezzo della camera di Burker.

**Culture cellulari.** Le cellule vengono utilizzate immediatamente o coltivate in terreno RPMI 1640 a 37°C in ambiente umidificato contenente CO<sub>2</sub> 5%.

**Analisi citofluorimetrica.** L'analisi dei marcatori di superficie tipici della leucemia linfatica cronica di tipo B utilizza l'immunofluorescenza diretta relativa ai seguenti anticorpi: CD3-FITC, CD19-FITC, CD-5PE, CD23-PE, CD38-PE e CD79β-PE. Le cellule sono monitorate con FACScalibur (BD Biosciences, Immunocytometry System) e i dati sono processati mediante CellQuest software (BD).

**Purificazione di proteine ricombinanti.** La proteina ricombinante esprime il dominio SH3 di Lyn fuso a GST è espressa e purificata secondo il protocollo presente in(63). La proteina ricombinante esprime il dominio SH2 di Lyn sempre fuso a GST è stata espressa e purificata secondo il metodo riportato in (64).

I costrutti ricombinanti HS1ΔN-Term, HS1ΔSH3 e HS1ΔPro-rich, che corrispondono alle sequenze HS1[1-207], HS1[403-486] e HS1[324-393] rispettivamente, sono espressi e purificati secondo le metodiche riportate in (59).

### **2.3 Metodiche specifiche utilizzate per lo studio dei Disordini Mieloproliferativi.**

**Preparazione della sospensione di piastrine.** Questa metodica è stata eseguita nel laboratorio del Prof. Deana. Le piastrine vengono isolate da sangue fresco prelevato da donatori sani o pazienti. Il sangue, prelevato dalla vena antecubitale, viene subito mescolato con l'anticoagulante ACD (70 mM acido citrico, 85 mM citrato sodico, 110 mM D-glucosio) in quantità pari ad un decimo del suo volume. Il sangue viene quindi centrifugato a 200 g per 20 minuti a temperatura ambiente, per ottenere la sedimentazione dei globuli rossi ed avere così il plasma ricco di piastrine (PRP) costituente il sopranatante.

Al PRP prelevato si aggiungono prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) 0.8 µg/ml ed apirasi 65 mU/ml allo scopo di prevenire un'eventuale attivazione delle piastrine durante la

loro preparazione: infatti la prostaciclina stimola l'adenilato ciclasi, aumentando la concentrazione intracellulare di cAMP (noto inibitore dell'attivazione piastrinica).

L'apirasi invece degrada l'agonista ADP eventualmente formatosi.

Quindi si procede ad un'ulteriore centrifugazione a 200 g per 5 minuti al fine di eliminare i globuli rossi ancora presenti ed il supernatante così ottenuto viene prelevato e ricentrifugato a 800 g per 20 minuti. Il sopranatante, costituente il plasma povero di piastrine (PPP), viene con cura rimosso e le piastrine impaccate sul fondo della provetta vengono risospese in tampone fisiologico Tyrode (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosio e 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) e diluite in modo opportuno. Normalmente si lavora ad una concentrazione finale di circa  $225 \times 10^6$  di piastrine/ml.

**Conta piastrinica.** Questa metodica è stata eseguita nel laboratorio del Prof. Deana La concentrazione delle piastrine, risospese in tampone di Tyrode, viene valutata mediante un metodo turbimetrico, basato sulla misura di assorbanza ottica alla lunghezza d'onda di 640 nm (alla quale praticamente non ci sono gruppi cromofori assorbenti).

Dal valore di densità ottica, letto allo spettrofotometro (UVIKON 810P), si risale al numero di piastrine, mediante una curva di taratura standard precedentemente preparata sulla base della conta eseguita al microscopio ottico utilizzando la camera conta globuli di Thoma. Una concentrazione di  $225 \times 10^6$  di piastrine/ml corrisponde, con buona approssimazione, ad una lettura di densità ottica pari a circa 1,200.

**Stimolazione piastrinica con trombina in assenza e presenza di inibitori.** Dopo aver ottenuto la concentrazione desiderata un certo volume di piastrine viene prelevato dalla provetta e depositato in una cuvetta di plastica. Si lascia preincubare con 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> ed eventuali inibitori per 10 minuti a 37°C, dopodiché si fornisce uno stimolo aggregante. Lo stimolo utilizzato nel nostro studio è costituito da trombina.

**Fosforilazione di membrane eritrocitarie da parte di Syk e Lyn.** 10  $\mu$ g di membrane eritrocitarie vengono fosforilate da p38<sup>Syk</sup> nella seguente miscela di incubazione: 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ M sodio ortovanadato, 20 mM ATP, 30 ng di p38<sup>Syk</sup> per 10 minuti a 30°C. Al termine dell'incubazione vengono centrifugate per 20 minuti su microcentrifuga a 14000

rpm. Il precipitato viene lavato per 3 volte con 1 ml di tampone composto da 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,5), 0,05 mM PMSF, 0,02%NaN<sub>3</sub> ed infine viene ripreso in 70 µl dello stesso tampone. Le membrane eritrocitarie, fosforilate da Syk, sono incubate nelle stesse condizioni viste sopra, ma in presenza di 20µM [ $\gamma^{32}$ ]ATP e 20 ng di Lyn. Il precipitato viene lavato per 3 volte con 1 ml di tampone di lavaggio prima descritto ed infine ripreso in 70 µl dello stesso (64).

**Saggio di attività fosfatasica.** 50 x 10<sup>6</sup> piastrine non stimulate sono incubate a 37°C per 5 minuti in presenza di banda3 previamente fosforilata in modo sequenziale dalle tirosin-chinasi Syk e Lyn con [ $\gamma^{32}$ P]ATP. L'incubazione viene effettuata in assenza e presenza di 0,5 mM pervanadato e di 2µM calpeptina. Si prelevano quindi 50 µl e si blocca la reazione con 15 µl di Buffer A. Si sottopongono i campioni a SDS/PAGE e la radioattività incorporata é quantificata su Instant Imager Packard.

## **2.4 Metodi specifici utilizzati nello studio del differenziamento muscolare.**

**Culture cellulari.** Il modello sperimentale utilizzato è stato la linea cellulare di mioblasti murini C2C12, fornita dal laboratorio della Prof. L. Gorza. Le cellule sono seminate in piastre petri alla densità di 30000 per 9.6cm<sup>2</sup> e mantenute a 37°C in ambiente umidificato contenente il 5% di CO<sub>2</sub>.

La linea cellulare può essere indotta al differenziamento facendo crescere le cellule in un opportuno terreno di coltura. I terreni di coltura impiegati sono quindi due: un terreno proliferativo, costituito da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% siero fetale bovino, L-glutamina ed antibiotici. Per evitare un processo di differenziamento spontaneo, le cellule proliferanti non vengono fatte raggiungere una condizione di confluenza; un terreno differenziativo, composto da DMEM, siero di cavallo 2%, insulina 0.5 µg/ml, L-glutamina ed antibiotici.

**Gel elettroforesi bidimensionale.** La metodica prevede la separazione delle proteine in base al loro punto isoelettrico (prima dimensione) ed al loro peso molecolare (seconda dimensione).

Circa 2·10<sup>6</sup> cellule della linea cellulare C2C12 differenzianti alla sesta ora vengono risospese in 1 ml del Buffer isotonico B, sonicate e sottoposte a centrifugazio-

ne differenziale al fine di separare la frazione microsomiale come descritto precedentemente nel paragrafo 2.1.

La frazione microsomiale viene quindi risospesa in 125 µl di tampone di isoelettrofocalizzazione (IEF), costituito da 9 M urea, 2 M tiourea, 4% (p/v) CHAPS 65 mM DTT 0.5% (v/v) anfoliti (Bio-Lyte 3-10 buffer) (Biorad).

I campioni, dopo essere stati lasciati 30 min a temperatura ambiente sono centrifugati a 15000 g per 15 min ed il sopranatante viene caricato su una strip di 7 cm a gradiente di pH immobilizzato (pH 3÷6) (Biorad). Lasciata la strip 1.5 h a temperatura ambiente per un iniziale assorbimento passivo del campione, si procede con una reidratazione attiva di 12 h, applicando un potenziale di 50 V ed arrivando ad un voltaggio di 4000 V/strip. Successivamente, l'isoelettrofocalizzazione viene condotta a 20°C a 20000 Vh su *Protean IEF Cell* (Biorad).

Le strip vengono lasciate per 15 min a temperatura ambiente nel seguente tampone di equilibratura costituito da 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 20% (v/v) glicerolo, 2% (p/v) SDS e 2% (p/v) DTT. Successivamente i tioli ridotti vengono alchilati, lasciando la strip per 15 min nel tampone di equilibratura cui viene aggiunta 2.5% (p/v) iodoacetammide.

Per effettuare la corsa elettroforetica nella seconda dimensione, la strip viene caricata su gel al 10% SDS/PAGE utilizzando l'apparato *Protean II mini* (Biorad). L'elettroforesi viene effettuata fornendo una corrente di 25 mA/gel.

**Frazionamento subcellulare mediante gradiente OptiPrep™.**  $6 \cdot 10^6$  cellule vengono sonicate in 1 ml di tampone isotonico B e quindi centrifugate 10 min a 1000 g per sedimentare i nuclei e le cellule non rotte.

Il sopranatante viene successivamente centrifugato per 30 min a 105000 g a 4°C, così da separare il citosol (sopranatante) dalla frazione particolata post-nucleare (pellet).

Il pellet, risospeso in 200 µl di tampone B, viene caricato su 3 ml di gradiente discontinuo di OptiPrep™ (iodixanolo 60% p/v in acqua), preparato usando diluizioni al 10, 15, 20, 25 e 30% in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente cocktail di inibitori proteasici e fosfatasici. Si procede quindi ad una centrifugazione a 100000 g per 3 h a 4°C. Il gradiente viene successivamente suddiviso in 15 frazioni da 200 µl che vengono raccolte dall'alto del gradiente, secondo quanto riportato in (65).

**Trattamento con proteinasi K.** Le frazioni del gradiente discontinuo di OptiPrep™ che corrispondono al comparto subcellulare dell'ER di cellule C2C12 differenzianti 6 ore vengono riunite e diluite all'8% e quindi centrifugate per 1 h a 105000 g a 4°C. Il pellet viene risospeso nel tampone isotonic B senza inibitori di proteasi, in assenza ed in presenza di Triton X-100 1%. La reazione di proteolisi è stata effettuata incubando i campioni a temperatura ambiente per 45 min con 100 ng/ml di proteinasi K. La reazione viene bloccata aggiungendo il cocktail di inibitori proteasici per avere una concentrazione finale 1X.

Per verificare l'accessibilità delle proteine di interesse all'attività enzimatica della proteinasi K i campioni sono stati analizzati mediante Western blot.

**Immunofluorescenza sulla linea cellulare C2C12.** La tecnica permette di visualizzare, mediante immunomarcatura con anticorpi coniugati a fluorofori aventi diverse capacità ottiche, la co-localizzazione di due proteine.

A questo scopo, le cellule C2C12 (circa  $5 \cdot 10^4$ ) vengono seminate in piastre da 24 pozzetti su vetrini da microscopia.

In seguito al trattamento, le cellule vengono lavate 3 volte con PBS 1X, per rimuovere il terreno di coltura, e quindi fissate in paraformaldeide 2% (p/v) per 30 min a 4°C.

Dopo 3 lavaggi con PBS 1X, le cellule vengono permeabilizzate con Triton X-100 0.2% (v/v) per 10 min a 4°C e quindi, in seguito ad altri 3 lavaggi con PBS 1X, in cameretta umida viene effettuata l'incubazione di 1 h a 37°C con gli anticorpi primari in rapporto di volume 1:1 e diluiti in sieroalbumina al 1%.

Per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario vengono fatti 3 lavaggi di 10 min in PBS 1X e quindi si procede con l'incubazione di 1 h a 37°C in cameretta umida con gli anticorpi secondari coniugati a fluoroforo come tritc (tetrametilrodamina isotiocianato,  $\lambda_{ex}$ = 550 nm,  $\lambda_{em}$ = 570 nm) e fitc (fluoresceina isotiocianato,  $\lambda_{ex}$ = 495 nm,  $\lambda_{em}$ = 520 nm).

Per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario vengono fatti 3 lavaggi in PBS 1X, ciascuno di 10 min.

Per ottenere la colorazione del nucleo, le cellule vengono incubate a temperatura ambiente 3 min con il fluoroforo Hoechst 33258 ( $\lambda_{ex}$ = 365 nm,  $\lambda_{em}$ = 465 nm), diluito 1:40000 in PBS 1X. Dopo 3 lavaggi con PBS 1X di 10 min, i vetrini vengono montati su vetrini portaoggetto con la soluzione FluorSave.

Le cellule vengono osservate al microscopio a fluorescenza Axio Vert 100 Zeiss, dotato di videocamera digitale a 12 bit (Micromax Princeton Instruments). Le immagini vengono acquisite ed elaborate utilizzando il software Metamorph (Universal Imaging).

**Immunogold.**  $2 \cdot 10^6$  cellule C2C12 proliferanti sono state riprese con PBS 1X e quindi centrifugate 5 min a 1500 g. Il pellet è stato fissato utilizzando il seguente protocollo: (i) 2 h a temperatura ambiente in una soluzione costituita da paraformaldeide 4% e glutaraldeide 0.25%; (ii) disidratazione del campione, effettuando incubazioni di 10 min in etanolo a concentrazioni crescenti (15%, 35%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%); (iii) incubazione del campione in una soluzione etanolo 50% e resina London resin white (LRW) 50% per tutta la notte a 4°C in agitazione meccanica; (iv) 2 h in resina LRW 100%; (v) 4 h in resina LRW 100%; (vi) inclusione in cellette di agar con resina pura.

Il campione così preparato viene lasciato in stufa a 52°C per 3 giorni.

Sezioni ultrasottili vengono poste sopra una griglia d'oro e lavate con PBS 0.01 M, pH 7.2, incubate per 20 min in tampone BSA 1% sciolta in PBS e trattate con gli anticorpi primari anti-Fyn ed anti-Grp94. Dopo lavaggio con PBS, le sezioni sono incubate con gli anticorpi secondari coniugati a particelle di oro colloidale (15 nm di diametro per l'anticorpo secondario di Fyn, 10 nm per l'anticorpo secondario di Grp94). Le sezioni vengono colorate con acetato di uranile, trattate con piombo citrato ed esaminate al microscopio elettronico. Si eseguono esperimenti di controllo eliminando l'incubazione delle sezioni con l'anticorpo primario.

***Risultati e discussione***  
***Parte Prima***



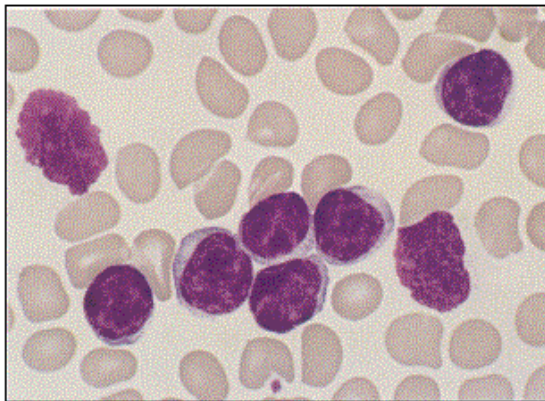
# 1. LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA DI TIPO B

## 1.1 Patologia e diagnosi.

La leucemia linfatica cronica di tipo B (B-LLC) è la forma di leucemia più frequente nel mondo occidentale con un'età media di insorgenza intorno ai 65 anni. Tale patologia è caratterizzata da un accumulo di piccoli linfociti B monoclonali nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici periferici (linfonodi e milza) (66).

Nella maggior parte dei casi la diagnosi avviene occasionalmente in quanto i pazienti godono di pieno benessere fisico. All'esame emocromocitometrico presentano un aumento dei globuli bianchi (leucocitosi) ed un aumento volumetrico di uno o più linfonodi delle stazioni linfoghiandolari superficiali.

Anche lo striscio di sangue periferico offre utili informazioni diagnostiche: l'aspetto dei linfociti nella B-LLC è distinguibile da quello di altri linfociti neoplastici e molti di essi tendono a rompersi allo striscio sul vetrino, originando le cosiddette "ombre di Gumprecht" (Figura 5).



**Figura 5.** Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da B-LLC. In viola linfociti leucemici che originano le "ombre di Gumprecht" a causa della loro rottura.

Benché sia stata considerata a lungo un'unica malattia, il decorso clinico è eterogeneo. Alcuni pazienti presentano un decorso clinico aggressivo con un rapido incremento delle cellule malate nel sangue tale da richiedere trattamenti terapeutici molto aggressivi: le ricadute sono comuni ed i soggetti affetti incurabili. Altri pazienti hanno un decorso stabile (possono sopravvivere anche per molti anni dopo la diagnosi) tale da non richiedere trattamenti ed eventualmente soccombere per

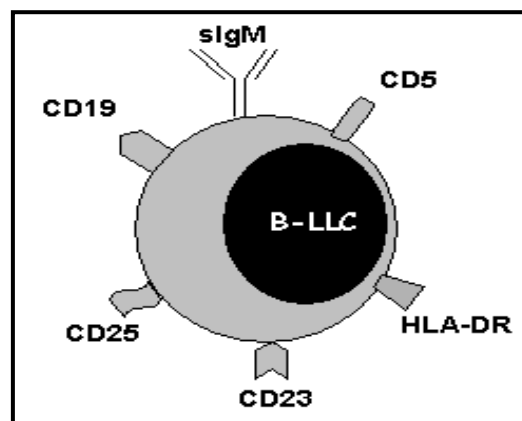
malattie collegate. Di seguito viene riportata la classificazione dei pazienti affetti da LLC secondo gli studi di Rai e Binet (Tabella 3) (67).

| SISTEMA | STADIO | RISCHIO    | CARATTERISTICHE                                                                   |
|---------|--------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Rai     | 0      | Basso      | Linfocitosi nel sangue e midollo                                                  |
|         | I      | Intermedio | Linfocitosi e noduli ingrossati                                                   |
|         | II     | Intermedio | Linfocitosi, spleno-epatomegalia                                                  |
|         | III    | Elevato    | Linfocitosi ed anemia                                                             |
|         | IV     | Elevato    | Linfocitosi e trombocitopenia                                                     |
| Binet   | A      | Basso      | Hb $\geq$ 10g/dl, piastrine $>100\cdot10^9/l$<br>al max 2 aree nodulari coinvolte |
|         | B      | Intermedio | Hb $\geq$ 10g/dl, piastrine $>100\cdot10^9/l$<br>organomegalia maggiore di A      |
|         | C      | Elevato    | Hb $\leq$ 10g/dl, piastrine $<100\cdot10^9/l$<br>organomegalia                    |

**Tabella 3.** Stadi clinici dei pazienti classificati secondo Rai e Binet

## 1.2 Le caratteristiche molecolari del linfocita B leucemico.

L'analisi fenotipica del linfocita B leucemico, condotta tramite immunofluorescenza e citofluorimetria, ha dimostrato che tutte le cellule LLC esprimono sulla superficie della membrana plasmatica molecole caratteristiche del linfocita B normale attivato, quali CD19<sup>+</sup> (Cluster of Differentiation 19) e CD21<sup>+</sup>, ed altri non specifici per la linea B come CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e HLA-DR (Human Leukocyte Antigens), e livelli ridotti in membrana di IgM, IgD e CD79 $\beta$  (68,69) (Figura 6).



**Figura 6.** Fenotipo di un linfocita B leucemico.

L'eterogeneità riscontrata nel manifestarsi della patologia viene associata allo stato di mutazione dei geni *IgV<sub>H</sub>* (Immunoglobulin Variable region Heavy-chain) e ai livelli di espressione di CD38<sup>+</sup> e ZAP70 (Zeta chain Associated Protein kinase 70) (70,71).

I geni *IgV<sub>H</sub>* codificano per le catene pesanti e leggere delle immunoglobuline. La trasduzione del segnale nel linfocita B è mediata dal BCR (B-cell Receptor) un'immunoglobulina presente sulla superficie cellulare. Ciascuna cellula B normale è caratterizzata da differenti BCR, i quali possono potenzialmente interagire con qualsiasi tipo di antigene. Nelle catene pesanti delle Ig, questa diversità è programmata dalla combinazione tra uno dei 51 segmenti del gene che codifica per la regione variabile (*V*), uno dei 27 segmenti del gene codificante la regione di diversità (*D*) e tra uno dei 6 codificanti la regione joining (*J*). La non precisa congiunzione tra *V* e *D* e tra *D* e *J* è seguita dalla delezione o dall'inserzione di nucleotidi, tanto che il segmento *D* potrebbe comparire in tutte e tre le strutture finali. Le catene leggere delle Ig non sono molto diverse tra loro in quanto presentano solo i segmenti *V* e *J* (72).

La funzione di CD38<sup>+</sup> nella LLC si basa sulla stimolazione, in seguito all'interazione con il suo ligando solubile CD31, di vie di segnale che promuovono la proliferazione dei linfociti B leucemici incrementandone la sopravvivenza.

ZAP-70 appartiene alla famiglia della tirosin-chinasi Syk, quest'ultima coinvolta nella trasduzione del segnale mediato dal BCR nelle cellule B. ZAP-70 invece è espressa prevalentemente nelle cellule T ed interviene nella trasmissione dei segnali generati dall'attivazione del TCR (T-Cell Receptor) (73).

Lo stato di mutazione dei geni *IgV<sub>H</sub>* permette di dividere i pazienti affetti da leucemia linfatica cronica in due gruppi: non mutati LLC (U-LLC) cui si associa un decorso clinico rapido ed aggressivo; mutati LLC (M-LLC) caratterizzati invece da un decorso clinico lento e poco aggressivo. Poiché l'analisi delle sequenze geniche per determinare lo stato di mutazione dei geni *IgV<sub>H</sub>* è laboriosa e non utilizzabile come metodo di routine nei laboratori di diagnostica, si utilizzano come marcatori alternativi CD38<sup>+</sup> e ZAP-70. In particolare l'espressione di questi è associata a geni *IgV<sub>H</sub>* non mutati e ad una prognosi sfavorevole, al contrario bassi livelli di CD38<sup>+</sup> e ZAP-70 sono caratteristici di geni *IgV<sub>H</sub>* mutati e prognosi favorevole. Mentre si possono verificare delle discordanze tra l'espressione di CD38<sup>+</sup>

e le mutazioni somatiche dei geni *IgV<sub>H</sub>*, l'espressione di ZAP-70 correla per il 93% dei casi (70,74,75).

Marcatori prognostici della malattia possono essere ricercati anche in alcune rare lesioni citogenetiche che molte volte compaiono nel corso della malattia. La più comune è una delezione *13q14* che si riscontra in più del 50% dei casi. Questa delezione predispone i cloni di cellule B leucemiche a mutazioni aggiuntive. E' interessante notare che i pazienti con mutazioni somatiche dei geni delle Ig hanno la delezione *13q14*. Al contrario, i pazienti che non presentano i geni delle Ig mutati portano la trisomia del cromosoma 12, con un'incidenza di circa il 25%. Altre delezioni sono: *11q22-23*, *17p13* e *6q21*. La delezione del gene *11q23* si presenta in circa il 20%. In questo è molto frequente la delezione del gene ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) coinvolto nel "pathway" di p53. La delezione del gene *17p13* è invece coinvolta nelle aberrazioni del gene p53. Entrambi i geni sono coinvolti nell'apoptosi e le mutazioni cromosomiche di questi conferiscono resistenza ai trattamenti chemioterapici. Inoltre queste ultime delezioni sono associate a pazienti con una prognosi infausta e non mutati geni *IgV<sub>H</sub>*.

Le delezioni del cromosoma 6 sono presenti in circa il 6% dei casi e causano eventi secondari riconducibili a prognosi intermedie (72).

### **1.3 LLC: un equilibrio tra proliferazione e morte cellulare.**

Per lungo tempo, la leucemia linfatica cronica è stata considerata una neoplasia in cui l'accumulo cellulare era dovuto ad una mancata apoptosi in seguito a difetti genetici con minima proliferazione di nuovi cloni leucemici (76).

Evidenze sperimentali recenti hanno invece dimostrato che la LLC è un accumulo di cellule B abnormali dovuto ad uno squilibrio tra il processo di proliferazione e quello di morte cellulare. In questo contesto, l'ammasso di cellule leucemiche riscontrato non è dovuto solo all'immortalità dei cloni ma anche ad un'attiva generazione di sub-cloni che in breve tempo sono in grado di modificare il rapporto tra proliferazione e morte. In riferimento ai pazienti, si può supporre che i due processi siano in equilibrio quando la conta dei linfociti è relativamente bassa o comunque stabile, o vi sia uno sbilanciamento a favore dell'uno o dell'altro quando si ha un aumento sconsiderato del numero di cellule B circolanti (77).

Gli studi prima citati non indicano ancora se questi due processi sono attivi in tutti i cloni leucemici o solo in alcuni che probabilmente presentano dei marcatori di superficie specifici per l'interazione con fattori di crescita e/o di morte cellulare (77).

Sorprendentemente i profili di espressione genica hanno dimostrato però che le cellule LLC sono simili a cellule B normali recentemente stimolate, tanto da paragonarle a cellule B della memoria (cellule cioè che hanno già incontrato l'antigene) (78,79). Il fatto che siano cellule attivate implica che i cloni LLC vengano continuamente stimolati *in vivo* benché non sia ancora documentato se le cellule completino il ciclo cellulare e si dividano. Poiché i linfociti leucemici non ricircolano come quelli B normali e i segnali di sopravvivenza e proliferazione sono limitati ai tessuti solidi, è plausibile pensare che solo alcuni cloni possano interagire con questi, limitando quindi i membri che sopravvivono e vanno a far parte del pool di accumulo (77).

Le zone anatomiche in cui le cellule LLC nascono e sopravvivono grazie all'aiuto di altre cellule non leucemiche sono i linfonodi (dette zone pseudofolicolari o centri proliferativi) e in minima parte il midollo. Qui i linfociti leucemici sono molto più grandi rispetto al normale ed esprimono marcatori del ciclo cellulare quali Ki-67 e la ciclina D1 oltre ad alcune molecole anti-apoptotiche (80,81).

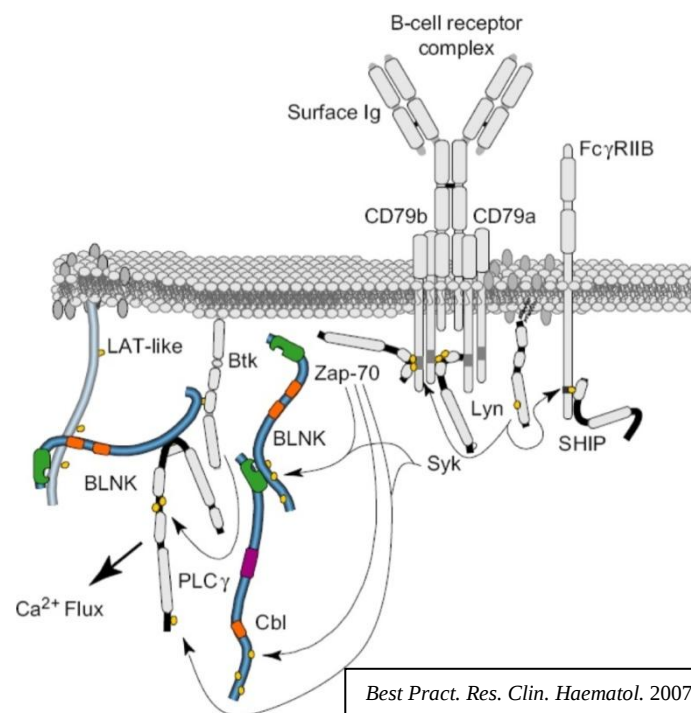
Le cellule non B che assistono quelle leucemiche di tipo B sono linfociti T CD4<sup>+</sup> che esprimono CD40L, che facilitano la comunicazione tra le cellule LLC e le cellule dendritiche che presentano l'antigene. Inoltre la stimolazione di cellule LLC indotta da cellule T CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> salva i linfociti leucemici dall'apoptosi ed induce proliferazione. Le stesse LLC secernono chemochine come CCL7 e CCL22 che attraggono i linfociti T nelle zone pseudofolicolari. Altri fattori che influenzano la proliferazione degli LLC sono le cellule stromali e varie citochine come VEGF, SDF-1 e IL-4 (77).

#### **1.4 Signaling nella leucemia linfatica cronica: il BCR.**

I segnali di proliferazione e morte cellulare prima descritti vengono recepiti dalle cellule B mediante interazione con il BCR, struttura di membrana che propaga efficientemente gli stimoli al nucleo del linfocita B (68).

Il complesso del BCR si trova in ciascun cellula B e comprende delle Immunglobuline di superficie (sIg) associate covalentemente con il dimero CD79 $\alpha$ /CD79 $\beta$ . Le code citoplasmatiche di queste contengono gli ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) sequenze che permettono in certe condizioni, l'ancoraggio di alcune chinasi ed adattatori proteici coinvolti nella trasduzione del segnale generato dal BCR.

L'interazione delle sIg con l'antigene determina la dimerizzazione del recettore e la sua traslocazione nei "lipid rafts" dove viene attivata la prima molecola trasduttrice del segnale: Lyn, tirosin-chinasi della famiglia Src. Questa fosforila due tirosine situate nelle sequenze ITAM e crea i siti di interazione per i domini SH2 della tirosin-chinasi Syk. Dopo attivazione, Syk genera dei secondi messaggeri che richiedono la fosforilazione tirosinica per fungere da proteine adattatrici, come ad esempio B-cell linker protein (BLNK). Questa rappresenta una molecola chiave nella mediazione del segnale regolando la funzione e lo sviluppo della cellula B (82,83).



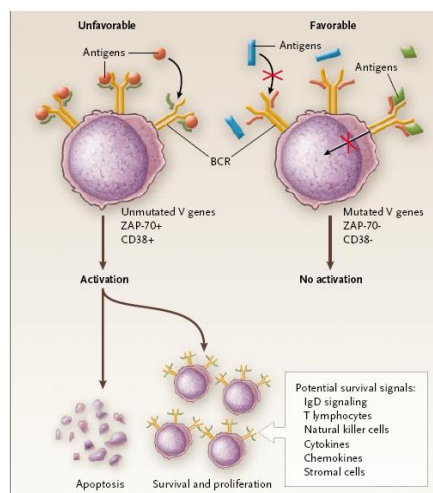
**Figura 7. Modello del BCR in pazienti B-LLC che esprimono ZAP-70.**

Sulla superficie cellulare ci sono anche delle strutture che fungono da inibitori dell'attivazione del BCR come FcγRIIB (Fc receptor for Ig) i cui domini citoplasmatici contengono gli ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inactivation Motif).

Questi dopo fosforilazione da parte di Lyn possono legare delle tirosin-fosfatasi con domini SH2 come SHIP, che una volta attivate, defosforilano le molecole trasduttrici del segnale inattivando la cascata attivata dall'interazione delle sIg con l'antigene (83) (Figura, 7).

Le cellule B leucemiche generalmente hanno una diminuita capacità di risposta al BCR, anche se tra i sottogruppi prima citati esiste una diversa responsività alla stimolazione. Quest'ultima potrebbe essere dovuta a bassi livelli di espressione delle sIg, inadeguati livelli o disfunzioni della tirosin-chinasi Syk o a mutazioni di CD79 $\beta$  (84). Studi condotti su Syk hanno rilevato che non vi sono alterazioni del livello proteico della tirosin-chinasi né difetti dell'attivazione della stessa dopo stimolo (85).

Benché il gruppo U-LLC presenti un basso livello di sIg, le cellule leucemiche di questi pazienti rispondono allo stimolo similamente ai linfociti B normali. Tale capacità di risposta si riteneva fosse legata all'espressione di ZAP-70 poichè esperimenti di co-immunoprecipitazione avevano dimostrato che sia Syk che ZAP-70 erano reclutati, dopo stimolo, alla membrana dove potevano potenzialmente fosforilare molecole a valle del segnale. Si è invece scoperto che la chinasi deputata allo scopo è la Syk in quanto ZAP-70 presenta un'inefficiente od assente attivazione (84,86).



*N.Engl. J. Med.* 2005. 8: 804-815.

**Figura 8. Differente responsività all'interazione con l'antigene dei pazienti affetti da B-LLC.**

Il sottogruppo M-LLC non risponde alla stimolazione BCR-dipendente in quanto sembra essere cristallizzato in uno stadio simile a quello dei linfociti B normali non responsivi all'antigene. La spiegazione di questo è da ricercare sia nello stato

di “anergia” che rispecchia la desensibilizzazione del recettore dopo attivazione, sia nell’incapacità di interazione con l’antigene a causa di alterazioni del BCR. Ad esempio per quest’ultimo si può dedurre una diminuzione del numero di molecole sulla superficie, una mutazione dell’immunoglobulina CD79 $\beta$ , un’overespressione di una variante di splicing di CD79 $\beta$  che non presenta il dominio extracellulare, oppure di mancata interazione del BCR con gli adattatori necessari alla trasduzione del segnale (68) (Figura 8).

### **1.5 Lyn nella Leucemia Linfatica Cronica di tipo B.**

Come sopra descritto Lyn è la tirosin-chinasi della famiglia Src predominante nei linfociti B, dove svolge un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale mediato dal BCR. La chinasi si pone così come regolatore essenziale di molti eventi di segnalazione successivi, comprese la maturazione, la proliferazione, l’apoptosi e la tolleranza delle cellule B (82).

E’ stato dimostrato nel laboratorio dove ho svolto il dottorato di ricerca che Lyn in B-LLC possiede caratteristiche anomale (87). In particolare, il livello proteico di Lyn in cellule isolate da pazienti affetti da LLC risulta dalle 2,5 alle 5 volte superiore rispetto ai normali linfociti B. Questa over-espressione sembra non essere dovuta ad un aumento od ad una differente stabilità del mRNA, ma ad un differente turnover proteico, correlato ad una variazione nella regolazione del sistema di degradazione. Inoltre è stata determinata una diversa distribuzione sub-cellulare della chinasi: mentre nei linfociti B normali Lyn è localizzata solo ed esclusivamente nei microdomini di membrana “lipid rafts”, nelle cellule di pazienti affetti da LLC la chinasi è delocalizzata in tutta la superficie della membrana plasmatica, ma cosa ancora più straordinaria, è presente per 1/3 del totale nel citosol. Nelle cellule ematopoietiche, la presenza di Lyn nel citosol è una conseguenza del taglio da parte delle caspasi a livello dell’estremità N-terminale (regione con cui la chinasi interagisce con le membrane), ed è un meccanismo che si attiva in seguito all’apoptosi mediata dal BCR. Invece la localizzazione citosolica di Lyn in cellule B non stimulate è una proprietà unica dei linfociti di pazienti affetti da LLC. Probabilmente, tale delocalizzazione potrebbe essere dovuta a difetti nell’acilazione della chinasi (87). Inoltre, in cellule B-LLC quiescenti, la chinasi è costitutiva-

mente attiva e questa peculiarità è dimostrata anche da un'elevata Tyr-fosforilazione proteica basale e da una bassa risposta allo stimolo del BCR. Il trattamento dei linfociti leucemici con inibitori specifici per l'attività di Lyn, come PP2 e SU6656, ristabilisce l'evento apoptotico accompagnato da una diminuzione dell'attività chinasi Lyn-dipendente suggerendo una correlazione tra l'alta attività basale della chinasi e la mancata apoptosi delle cellule B leucemiche.



## 2. OBIETTIVI.

Come descritto nell'introduzione, Lyn, tirosin chinasi appartenente alla famiglia Src, possiede delle proprietà anomale nei linfociti B isolati da pazienti affetti da B-LLC, non riscontrate nei linfociti B normali (87).

In queste cellule leucemiche Lyn presenta:

- livelli proteici superiori, senza un aumento del suo mRNA;
- una maggiore attività specifica;
- una localizzazione anomala a livello della membrana plasmatica poiché la sua distribuzione è uniforme e non limitata ai microdomini "lipid rafts";
- una localizzazione citosolica che corrisponde ad 1/3 della proteina totale.

Lyn occupa una posizione strategica nelle cellule B e la sua funzione fisiologica è mediata non solo dal dominio catalitico ma anche da altri domini responsabili dell'interazione con particolari sequenze proteiche contenute nei diversi partners di interazione. A partire dall'estremità N-terminale Lyn presenta il dominio SH3 che interagisce con sequenze ricche in prolina, il dominio SH2 che riconosce fosfotirosine inserite in opportune sequenze consenso ed il dominio catalitico responsabile dell'interazione con alcune proteine "chaperone".

Per comprendere le ragioni della sua anomala localizzazione all'interno della cellula leucemica e le conseguenze nel determinare lo stato patologico di questa, il lavoro della mia tesi ha avuto come scopo quello di definire la possibilità che la tirosin-chinasi Lyn possa interagire con particolari partner mediante i suoi domini regolatori evidenziando un'eventuale correlazione con qualche fattore prognostico o con la gravità della malattia.

Questo lavoro è stato condotto in collaborazione con il gruppo del Prof. G. Semenzato che ha isolato i linfociti B da donatori sani e soggetti affetti da leucemia linfatica cronica clinicamente caratterizzati.

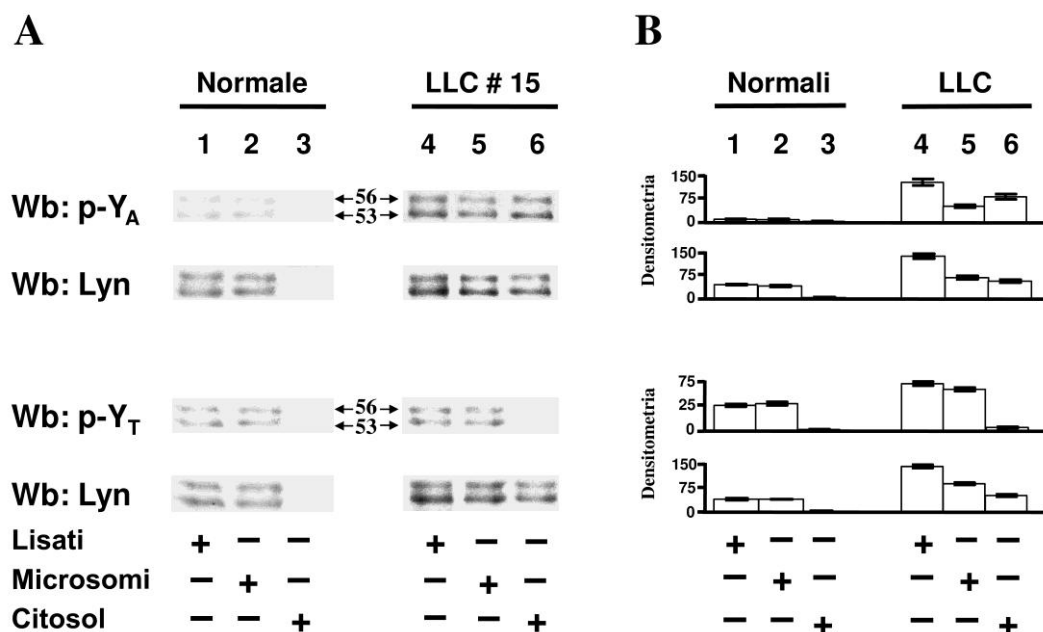


### 3. RISULTATI

#### 3.1 L'ELEVATA ATTIVITA' BASALE DI Lyn E' CORRELATA AL SUO ANOMALO STATO DI FOSFORILAZIONE IN B-LLC.

Al fine di comprendere il meccanismo molecolare che determina l'anomala attività basale della tirosin-chinasi Lyn in linfociti B di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica, si è analizzato lo stato di fosforilazione dei due siti regolatori dell'enzima quali la Y396 (Y<sub>A</sub>) attivatoria e la Y508 (Y<sub>T</sub>) inibitoria.

Gli esperimenti sono stati condotti su linfociti B normali, usati come controllo, e su cellule leucemiche isolate da 40 pazienti appartenenti a differenti stadi clinici e non sottoposti a trattamento farmacologico, come riportato nella tabella 1 in Materiali e Metodi. È stata eseguita una rivelazione anticorpale con anticorpi che riconoscono specificatamente le due tirosine regolatorie fosforilate di Lyn sia su lisati totali che sulle frazioni sub-cellulari microsomiale e citosolica.



**Figura 9. Verifica dello stato di fosforilazione della tirosin-chinasi Lyn in linfociti B normali e leucemici.** (A) Il lisato totale ed aliquote delle frazioni sub-cellulari (microsomi e citosol) di linfociti B normali (colonne 1, 2, 3) e B-LLC del paziente no.15 (colonne 4, 5, 6) in condizioni basali sono stati sottoposti a SDS/PAGE, Western blot e rivelazione anticorpale anti-pY<sub>A</sub> o anti-pY<sub>T</sub>. Le membrane dopo "stripping" sono state rivelate anti-Lyn. I pesi molecolari delle proteine di riferimento sono indicati al centro. (B) L'analisi densitometrica delle bande relative alle rivelazioni anticorpali anti-pY<sub>A</sub>, anti-pY<sub>T</sub> e anti-Lyn dei lisati totali, dei microsomi e del citosol di 5 normali (colonne 1, 2, 3) e 40 pazienti B-LLC (colonne 4, 5, 6) è mostrata in figura, I dati sono espressi come media  $\pm$  SD di tre esperimenti separati.

In Figura 9A è mostrato il risultato ottenuto da un donatore di linfociti B normali ed un paziente LLC, mentre in Figura 9B viene riportata l'analisi densitometrica delle rivelazioni anticorpali eseguite su 5 donatori sani e sui linfociti B isolati da tutti i 40 pazienti.

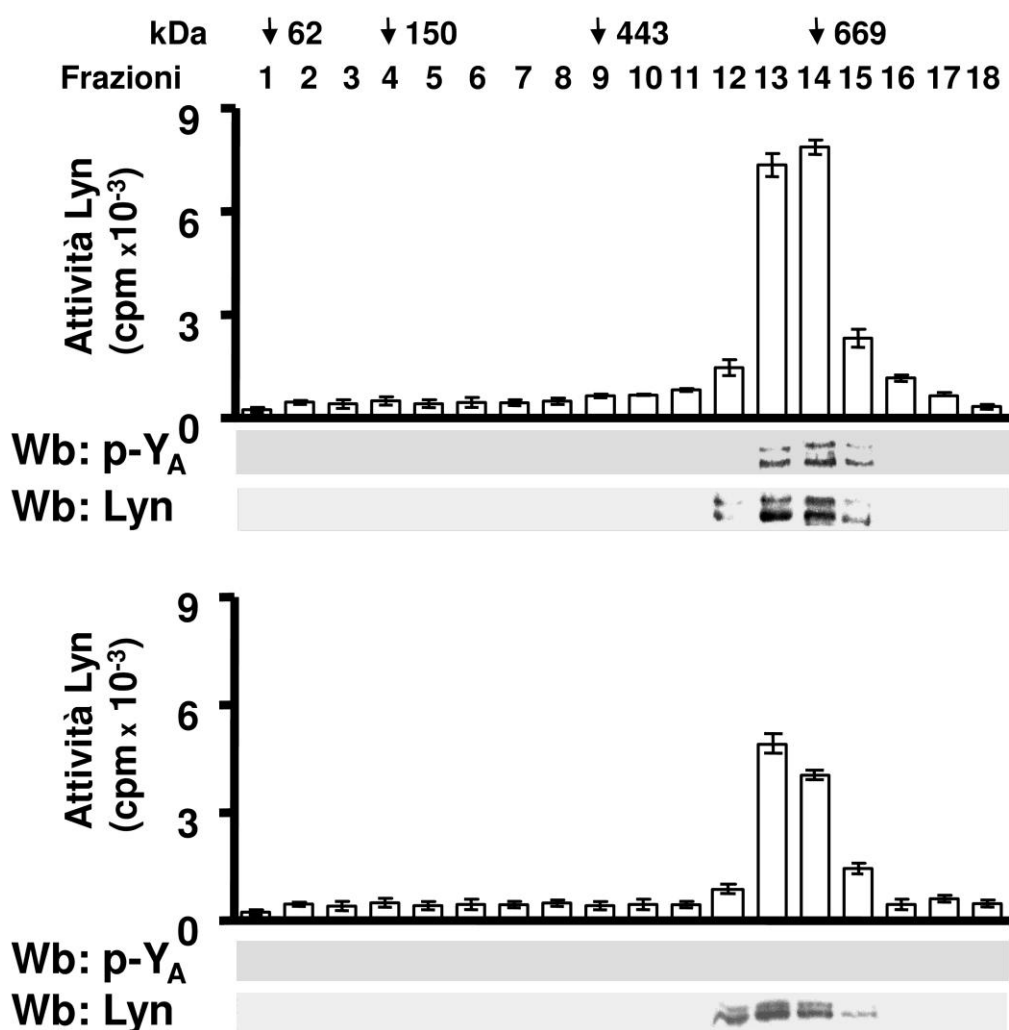
Come atteso, in cellule normali Lyn è localizzato esclusivamente nella frazione microsomiale ed immunoreagisce solamente con l'anticorpo anti-pY<sub>T</sub> (Figura 9A, colonna 2). La chinasi si trova quindi fosforilata nel sito inibitorio C-terminale e defosforilata nel sito catalitico, perciò in conformazione inattiva.

Come dimostrato precedentemente nel laboratorio dove ho svolto il dottorato (87), in cellule B-LLC la chinasi risulta over-espressa se comparata con le cellule di controllo (Figura 9A, colonne 1,4), ed una parte consistente dell'enzima (più del 30% del totale) si trova inoltre anomalmente localizzata nel citosol (Figura 9A, si confrontino colonne 2-3 e 5-6). Mentre la rivelazione anticorpale anti-pY<sub>T</sub> riconosce nei pazienti solo la frazione microsomiale di Lyn, l'anticorpo anti-pY<sub>A</sub> interagisce con la chinasi sia nella frazione microsomiale che in quella citosolica (Figura 9A, colonne 5,6). In particolare, la positività della frazione citosolica di Lyn all'anticorpo anti-pY<sub>A</sub> dimostra che l'enzima diversamente localizzato in cellule B leucemiche non stimulate si trova in conformazione attiva indotta dall'autofosforilazione della Y<sub>A</sub> nel loop di attivazione.

### **3.2 LA FORMA ATTIVA E CITOSOLICA DI Lyn PARTECIPA ALLA FORMAZIONE DI UN COMPLESSO MEDIANTE I SUOI DOMINI SH3 E CATALITICO.**

La tirosinchinasi Lyn, come le altre chinasi della famiglia Src, è una proteina modulare in quanto esplica le sue funzioni fisiologiche mediante domini di interazione che possono modularne l'attività attraverso interazioni intra- od intermolecolari (7,8). Poiché Lyn cumula nella frazione citosolica in conformazione attiva, sono state esaminate le interazioni tra i domini della chinasi ed i suoi potenziali partner al fine di capire se questi fossero in grado di determinare le caratteristiche anomale di Lyn nella leucemia linfatica cronica. A questo scopo il citosol di linfociti B dei 40 pazienti affetti da LLC è stato isolato e sottoposto separa-

tamente ad ultracentrifugazione differenziale su gradiente discontinuo di glicerolo (come descritto in Materiali e Metodi) ed in ciascuna frazione risultante è stata testata la presenza di Lyn mediante rivelazione anticorpale e saggio di attività tirosin-chinasica condotta *in vitro* usando il peptide cdc2 (6-20), substrato specifico per le tirosin-chinasi Src. Come dimostrato in Figura 10 (pannello in alto), la frazione citosolica di Lyn è inclusa in complesso di peso molecolare (PM) apparente di circa 600 kDa, relativo alle frazioni 12-14.



**Figura 10. Purificazione del complesso Lyn dal citosol di pazienti LLC.** Le cellule di B-LLC ( $15 \times 10^6$ ) vengono sottoposte a frazionamento subcellulare. 300µg di citosol vengono suddivisi in due aliquote e trattati in assenza (pannello superiore) o presenza di  $\lambda$ PPase (pannello inferiore). I campioni sono caricati su un gradiente lineare di glicerolo (10-40%) e centrifugati come descritto in Materiali e Metodi. Le frazioni sono raccolte dall'apice del gradiente. 10µl di tali frazioni sono utilizzati per saggiare l'attività tirosin-chinasica su substrato Src specifico cdc2 (6-20) e la radioattività incorporata rilevata mediante Instant Imager Packard. 50µl per ogni frazione del gradiente sono sottoposte a SDS/PAGE, e rivelazione anticorpale anti p-Y<sub>A</sub> e, dopo "stripping", anti-Lyn. Le frecce sono rappresentative delle posizioni dei pesi molecolari standard su gradiente di riferimento. I dati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 40 pazienti B-LLC.

La posizione del corrispondente PM lungo il gradiente è stata determinata dalla presenza di marcatori proteici con peso molecolare noto in un gradiente di riferimento.

Il profilo di distribuzione dell'attività enzimatica e della rivelazione anticorpale con l'anticorpo anti-pY<sub>A</sub> delle frazioni del gradiente dimostrano, come atteso, che Lyn inclusa nel complesso citosolico è presente nella sua conformazione attiva.

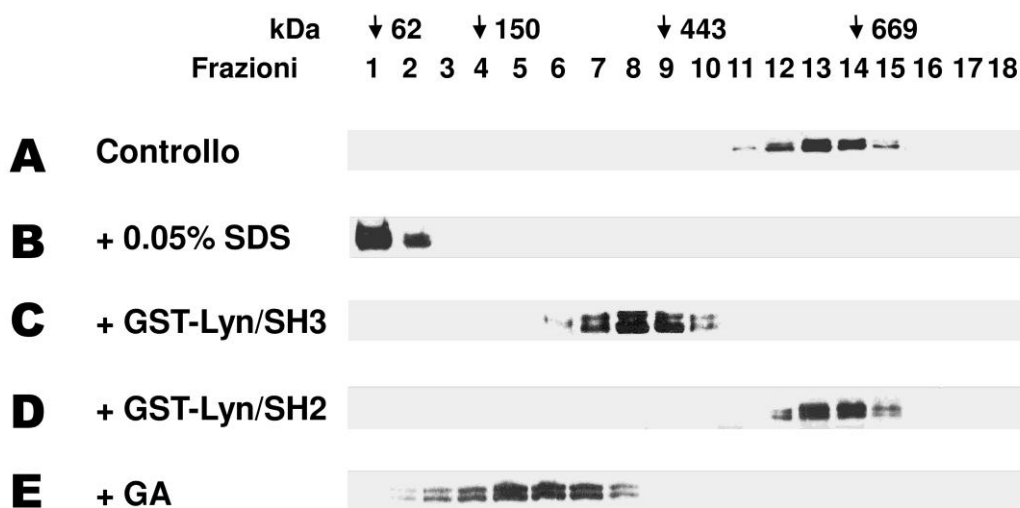
In parallelo, l'attività tirosin-chinasica delle frazioni del gradiente è stata saggiata su un substrato aspecifico come poly(GluTyr)<sub>4:1</sub> in presenza ed in assenza di PP2, inibitore selettivo dell'attività SFK (48). I dati ottenuti hanno dimostrato che l'attività chinasica in presenza dell'inibitore è abolita, suggerendo che l'attività tirosin-chinasica del complesso citosolico è esclusivamente catalizzata da Lyn (dati non mostrati).

Allo scopo di stabilire se la fosforilazione sia un evento necessario alla stabilizzazione del complesso, il citosol di cellule LLC è stato trattato con la fosfatasi aspecifica  $\lambda$ PPase (lambda protein phosphatase), che rimuove gruppi fosforilati dai residui di Tyr/Ser/Thr/His, e quindi sottoposto a gradiente discontinuo di glicerolo. Successivamente, ciascuna frazione è stata analizzata per la presenza di Lyn mediante rivelazione anticorpale e saggio di attività tirosin-chinasica *in vitro* sul peptide Src-specifico cdc2 (6-20). La Figura 10 (pannello in basso), mostra che il trattamento con  $\lambda$ PPase non determina una modificazione del PM della chinasi nel complesso, suggerendo che lo stato di fosforilazione proteica non sia necessario al mantenimento dello complesso. Possiamo inoltre affermare che l'interazione di Lyn con possibili ligandi non è mediata dal suo dominio SH2. Infine, come atteso, la diminuzione dell'attività di Lyn, riscontrata in seguito al trattamento con  $\lambda$ PPase, è causata dalla defosforilazione della tirosina Y<sub>A</sub> nel loop d'attivazione del dominio catalitico della chinasi.

### **3.3 NATURA DELLE INTERAZIONI PRESENTI NEL COMPLESSO CITOSOLICO DI Lyn.**

Al fine di determinare la natura delle interazioni che determinano l'inclusione di Lyn nel complesso citosolico, le frazioni del gradiente di glicerolo contenenti il

complesso (frazioni 12-14 della Figura 10, pannello superiore) sono state riunite, differentemente trattate e risottomesse ad un secondo gradiente di glicerolo. Come possiamo vedere in Figura 11A, questa procedura non altera le interazioni proteiche presenti nel complesso, come dimostrato dalla sedimentazione del complesso Lyn al PM atteso nel gradiente di riferimento. Al contrario, il trattamento con SDS, alla concentrazione finale dello 0.05% in condizioni non riducenti, determina una dissociazione di Lyn dal complesso tanto che la chinasi sedimenta come monomero, soprattutto nella frazione 1. Questi dati dimostrano che i ponti disolfuro non mediano il legame di Lyn con altre proteine presenti nel complesso (Figura, 11B).



**Figura 11. Analisi delle interazioni presenti nel complesso citosolico di Lyn in B-LLC.** Il complesso Lyn era purificato dal citosol di  $75 \times 10^6$  cellule leucemiche, come descritto nella figura 10 (pannello superiore). Le frazioni 13-14 sono state riunite e suddivise in 5 campioni, che sono stati incubati per 30 min a 4°C in assenza (A) o in presenza di 0.05% SDS (B), 0.1  $\mu$ M GST-Lyn/SH3 (C), 0.1  $\mu$ M GST-Lyn/SH2 (D) e 0.1  $\mu$ M geldanamicina (E), rispettivamente. I campioni sono quindi separatamente sottoposti gradiente di glicerolo come descritto in figura 10. 50  $\mu$ l per ogni frazione sono state sottoposte a SDS/PAGE, e rivelazione anticorpale anti-Lyn. Le frecce sono rappresentative delle posizioni dei pesi molecolari standard su gradiente di riferimento. I dati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 40 pazienti B-LLC.

Poiché Lyn, come le altre SFK, è una proteina modulare del segnale, abbiamo analizzato le interazioni mediate dai suoi domini SH3, SH2 e catalitico con ipotetiche proteine partners. Sono stati quindi approntati degli esperimenti di competizione con composti capaci di alterare la struttura del complesso Lyn citosolico in quanto in grado di spiazzare le interazioni endogene eventualmente presenti.

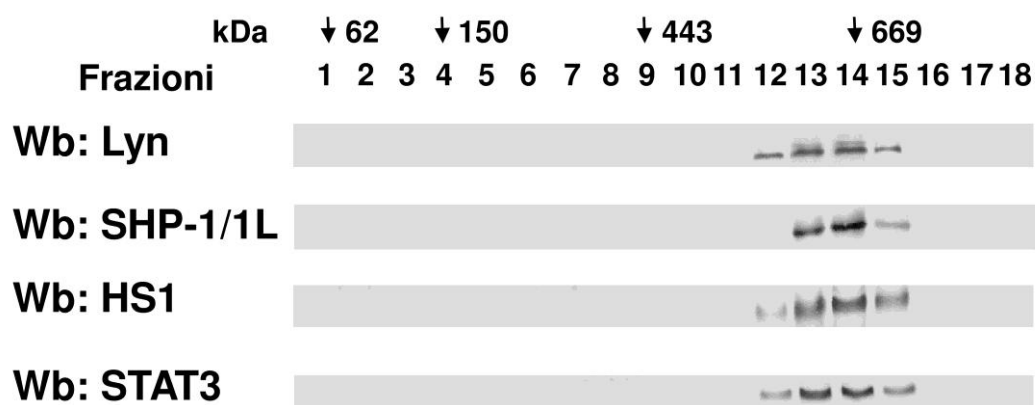
In seguito alla rivelazione anticorpale anti-Lyn delle frazioni dei gradienti ottenuti dal complesso parzialmente purificato e successivamente trattato con diversi composti, abbiamo dimostrato che in presenza del costrutto ricombinante esprime GST fusa con il dominio SH3 di Lyn, capace di competere per l'interazione con la sequenze ricche in prolina, Lyn dissocia dal complesso ed appare nelle frazioni 6-10, corrispondenti a complessi di peso molecolare inferiore (Figura, 11C). In questo modo abbiamo provato che l'inclusione di Lyn nel complesso è mediata dal suo dominio SH3. Al contrario, la presenza del dominio SH2 di Lyn fuso a GST non altera il PM del complesso confermando i dati ottenuti precedentemente con l'uso di  $\lambda$ PPase e supportando l'ipotesi che la formazione del complesso Lyn citosolico non è mediata dall'interazione del dominio SH2 di Lyn con proteine contenenti fosfotirosine (Figura, 11D). Infine il complesso Lyn è stato trattato con geldanamicina (GA), un inibitore di Hsp90, proteina la cui funzione principale è quella di stabilizzare proteine clienti, come le SFK, interagendo con il loro dominio catalitico (33). Il trattamento con GA promuove la dissociazione del complesso ad alto peso molecolare facendo apparire Lyn nelle frazioni corrispondenti a pesi molecolari inferiori (frazioni 3-8) dimostrando così che Lyn è un cliente della proteina-“chaperone” Hsp90 per mezzo del suo dominio catalitico (Figura, 11E).

Complessivamente, i risultati mostrati in Figura 11 suggeriscono che la forma attiva di Lyn cumula nel citosol incluso in un complesso multiproteico di circa 600 kDa, per mezzo dell'interazioni mediate dai suoi domini SH3 e catalitico.

### **3.4 IL DOMINIO SH3 DI LYN PROMUOVE L'ASSOCIAZIONE DELLA FORMA CITOSOLICA DELLA CHINASI CON SHP-1L E HS1.**

Per comprendere il ruolo del dominio SH3 di Lyn nella stabilizzazione del complesso citosolico e nel determinare le proprietà anomale della chinasi, abbiamo analizzato la presenza di potenziali ligandi che sono descritti in letteratura associare al dominio SH3 delle SFK come: Cbl, HS1, Akt, SHP-1L, SHP-2 e STAT3 (23, 88-92). A questo scopo, il complesso Lyn purificato a partire dal citosol di cellule B di 40 pazienti affetti da LLC è stato sottoposto ad un secondo gradiente di glic-

rolo. Le frazioni ottenute sono state saggiate per la presenza di Lyn e delle proteine prima citate tramite rivelazione anticorpale con anticorpi specifici (come riportato in Materiali e Metodi). I risultati ottenuti dimostrano che mentre Cbl, Akt e SHP-2 non fanno parte del complesso in quanto si trovano in frazioni del gradiente diverse rispetto a quelle dove sedimenta Lyn (dati non mostrati), HS1, SHP-1 e STAT3 invece co-sedimentano nelle stesse frazioni della chinasi (Figura, 12). Abbiamo quindi valutato per quest'ultime la capacità di legarsi direttamente con la tirosin-chinasi Lyn nel complesso.



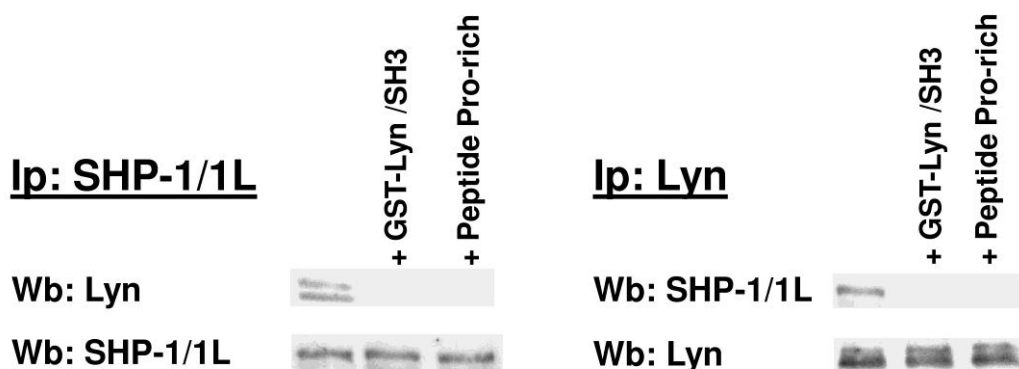
**Figura 12. Identificazione delle proteine presenti nel complesso citosolico di Lyn che interagiscono con il dominio SH3 della chinasi.** Le frazioni contenenti il complesso (13 e 14 della figura 10) sono riunite e risottomesse ad un ulteriore gradiente di glicerolo. Aliquote di 50µl sono state sottoposte a SDS/PAGE, Western blot e rivelazione anticorpale anti-Lyn, anti-HS1, anti-SHP-1L e anti-STAT3. Le frecce sono rappresentative delle posizioni dei pesi molecolari standard su gradiente di riferimento. I dati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 40 pazienti B-LLC.

**Interazione di Lyn con SHP-1L.** SHP-1 è una tirosin-fosfatasi coinvolta nella regolazione negativa del signaling delle cellule B (23,24). Infatti, dopo stimolo del BCR, questa viene reclutata in membrana dove esercita un'azione di defosforilazione tirosinica in grado di inibire il segnale trasdotto. SHP-1L è una isoforma di SHP-1 ed è predominante nei tessuti ematopoietici. Questa isoforma è più lunga di SHP-1 in quanto presenta 29 residui aminoacidici in più al livello C-terminale. In questa regione, SHP-1L presenta una sequenza ricca in prolina PVPGPPVLSP, potenziale sito di legame del dominio SH3 di Lyn. (23,91). Poiché non esiste un anticorpo specifico per SHP-1L, l'isoforma SHP-1L è stata identificata mediante un anticorpo che riconosce il dominio catalitico di entrambe le fosfatasi. La presenza di SHP-1 è stata poi esclusa in quanto è risultata negativa

la rivelazione anticorpale delle frazioni contenenti il complesso che utilizza un anticorpo che riconosce l'estremità C-terminale della stessa (dati non mostrati).

Come mostrato in Figura 13, l'immunoprecipitazione del complesso purificato (frazioni 12-14 della Figura 10) mediante gli anticorpi anti-SHP-1L e anti-Lyn, e le rispettive rivelazioni anticorpali, dimostrano che SHP-1L co-immunoprecipita con Lyn e che quindi le due proteine interagiscono nel citosol. Esperimenti di competizione mostrano che l'uso sia di un peptide sintetico Pro-rich (KGGRSRLPLPPLPPPG), che è stato descritto interagire specificatamente con il dominio SH3 di Lyn (63,93), sia del dominio ricombinante GST-Lyn/SH3 dissociano completamente la

tirosin-chinasi dalla tirosin-fosfatasi, avvalorando l'ipotesi che il dominio SH3 di Lyn interagisce nel complesso con la sequenza Pro-rich di SHP-1L.



**Figura 13. Verifica dell'associazione tra Lyn e SHP-1L.** Le frazioni del complesso (13 e 14) purificate dopo due gradienti di glicerolo, come descritto in figura 12, sono riunite e suddivise successivamente in aliquote differientemente trattate per 30 min a 4°C in assenza o presenza di 0.1 µM GST/SH3-Lyn e 0.1 µM Peptide Pro-rich. I campioni sono stati poi soggetti ad immunoprecipitazione con anticorpi anti-SHP-1L e anti-Lyn, e rivelati per la presenza di Lyn e SHP-1L, rispettivamente. I dati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 40 pazienti B-LLC.

### ***Interazione di Lyn con HS1 (Hematopoietic lineage cell specific protein***

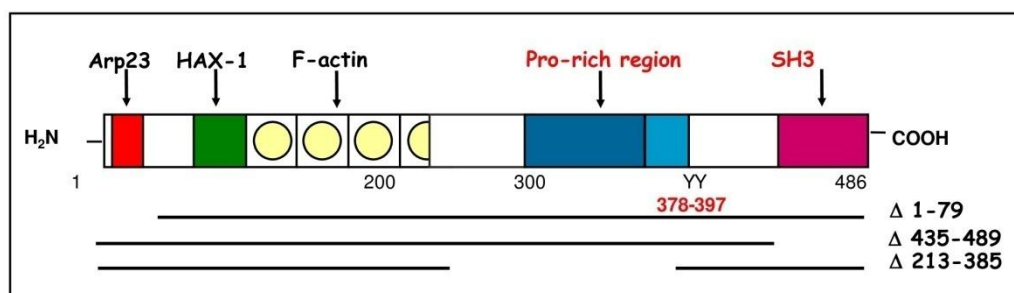
**1).** L'espressione della proteina HS1 è limitata alle cellule di origine ematopoietica ed è localizzata prevalentemente nel citoplasma. La funzione di HS1 non è nota. E' probabile che sia coinvolta nella trasduzione del segnale proliferativo e apoptotico indotto dal BCR e TCR (T Cell Receptor) perchè è la prima proteina a fosforilarsi in tirosina in seguito a stimolazione di tali recettori antigenici. La fo-

sforilazione avviene secondo un modello sequenziale: dapprima Syk fosforila i residui di Tyr378 e Tyr397 della proteina agendo come chinasi primaria e creando dei siti di legame ad alta affinità per il dominio SH2 di Lyn. A questo punto HS1 interagire con i domini SH2 di Lyn che fosforila il residuo di Tyr222 (94). L'azione di queste chinasi su HS1 ha importanza nel determinare la sua localizzazione: la fosforilazione da parte di Syk determina il suo spostamento dal citosol nei subdomini "lipid rafts" (95). Una volta in membrana, HS1 viene fosforilata in Tyr-222 da parte di Lyn, con conseguente traslocazione al nucleo (96). Abbiamo voluto determinare la presenza di HS1 nel complesso Lyn citosolico non solo perchè è descritto che la proteina può interagisce anche con il dominio SH3 delle SFK, ma in quanto recentemente è stato dimostrato che lo stato di fosforilazione di HS1 è associato alla prognosi dei pazienti affetti da LLC (97).

L'interazione tra HS1 e Lyn nel complesso citosolico è determinata da esperimenti di co-immunoprecipitazione simili a quelli utilizzati per determinare il legame tra la SHP-1L e la chinasi, come mostrato in Figura 14. Poiché HS1 contiene diversi motivi strutturali inclusa una regione Pro-rich (324-393) ed un dominio SH3 a livello del C-terminale (come presentato in Figura 15), si sono eseguiti esperimenti di competizione aggiungendo delle forme tronche ricombinanti di HS1 durante l'immunoprecipitazione anti-Lyn o anti-HS1 per identificare la regione di HS1 che interagisce con Lyn.



**Figura 14. Verifica dell'associazione tra Lyn e HS1.** Le frazioni del complesso (13 e 14) purificate dopo due gradienti di glicerolo, come descritto in figura 12, sono riunite e suddivise successivamente in aliquote differentemente trattate per 30 min a 4°C in assenza o presenza di 0.1 µM GST/SH3-Lyn, 0.1 µM HS1ΔN-term., 0.1 µM HS1ΔSH3, 0.1 µM HS1-ΔPro-rich e 0.1 µM Peptide Pro-rich. I campioni sono stati poi soggetti ad immunoprecipitazione con anticorpi anti-HS1 e anti-Lyn, e rivelati per la presenza di Lyn e HS1, rispettivamente. I dati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 40 pazienti B-LLC.



**Figura 15. Sequenza lineare di HS1 (sono riportati anche i mutanti).**

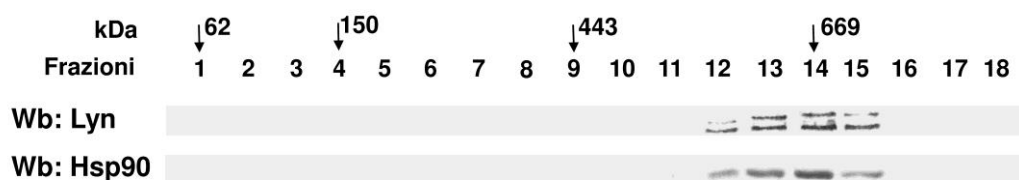
I risultati sono riportati in Figura 14. Il trattamento con GST/SH3-Lyn, HS1-ΔN-Tem e HS1-ΔSH3 impedisce il legame tra HS1 e Lyn. Al contrario, l'aggiunta del mutante che manca della sequenza Pro-rich non determina dissociazione, dimostrando che il dominio SH3 di Lyn interagisce con la sequenza Pro-rich di HS1. A conferma di tale ipotesi l'aggiunta del peptide sintetico Pro-rich, specifico per il dominio SH3 di Lyn, impedisce l'interazione tra la chinasi e HS1.

L'analisi della potenziale interazione tra Lyn e STAT-3, un attivatore della trascrizione con un putativo motivo Pro-rich, ha dimostrato che le due proteine non interagiscono direttamente.

### **3.5 IL DOMINIO CATALITICO DI Lyn INTERAGISCE CON LA “CHAPERONE” Hsp90 NEL COMPLESSO CITOSOLICO.**

Hsp90 è una “chaperone” che controlla la stabilità di moltissime proteine clienti, come le SFK, con funzioni importanti nelle vie di trasduzione del segnale. La formazione del complesso chinasi-Hsp90 è dettato dal riconoscimento da parte di Hsp90 della superficie del lobo N-terminale del dominio catalitico della chinasi aiutandola a rimanere in una conformazione attiva (24,34). La distruzione del complesso determina la degradazione delle proteine clienti via ubiquitina-proteasoma. Questo evento può essere ottenuto mediante GA, inibitore specifico della “chaperone”, che si lega alla tasca di legame per l'ATP di Hsp90. Ciò determina inibizione della funzione di Hsp90, dissociazione della “chaperone” e induce la degradazione delle proteine clienti (98).

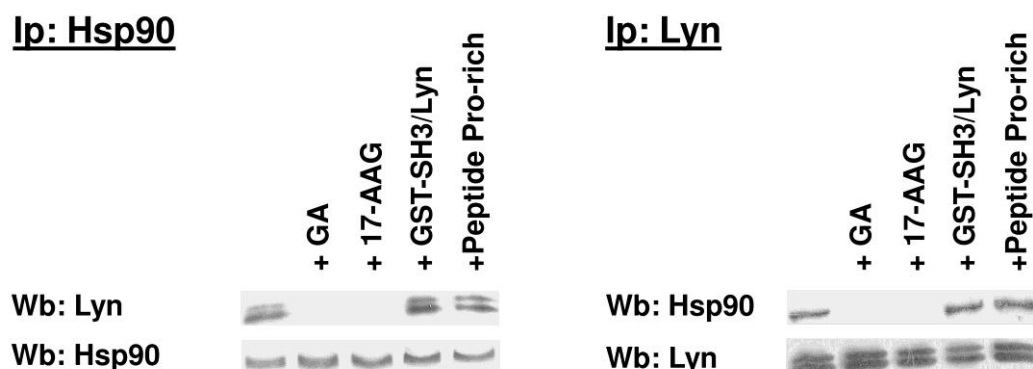
Al fine di determinare il ruolo del dominio catalitico di Lyn nella formazione del complesso citosolico, abbiamo cercato di determinare la presenza della “chaperone” Hsp90 all’interno del complesso basandoci sui dati ottenuti precedentemente con l’uso di GA. A questo scopo, il complesso Lyn purificato a partire dal citosol di cellule B di 40 pazienti affetti da LLC è stato sottoposto separatamente ad un secondo gradiente di glicerolo. Le frazioni ottenute sono state saggiate per la presenza di Lyn e Hsp90 tramite rivelazione anticorpale con anticorpi specifici (come riportato in Materiali e Metodi). I risultati in Figura 16 evidenziano come Lyn e Hsp90 sedimentino nelle stesse frazioni del gradiente di glicerolo (frazioni 12-14) supportando l’ipotesi che la “chaperone” possa far parte del complesso citosolico.



**Figura 16. Identificazione delle proteine presenti nel complesso citosolico di Lyn che interagiscono con il dominio catalitico della chinasi.** Le frazioni contenenti il complesso (13 e 14 della figura 12) sono riunite e risottomesse ad un ulteriore gradiente di glicerolo. Aliquote di 50µl sono state sottoposte a SDS/PAGE, Western blot e rivelazione anticorpale anti-Lyn, anti-Hsp90. Le frecce sono rappresentative delle posizioni dei pesi molecolari standard su gradiente di riferimento. I dati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 40 pazienti B-LLC.

Successivamente l’interazione fisica tra le due proteine è stata determinata attraverso esperimenti di co-immunoprecipitazione utilizzando anticorpi anti-Hsp90 e anti-Lyn. Gli immunocomplessi ottenuti venivano in seguito sottoposti a rivelazione anticorpale anti-Lyn e anti-Hsp90 rispettivamente, come riportato in Figura 17.

Il pre-trattamento del complesso Lyn citosolico con GA ed il suo derivato 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) induce, come atteso, dissociazione di Lyn da Hsp90. Al contrario, l’aggiunta del dominio GST-SH3/Lyn e del peptide Pro-rich non determina l’abolizione della co-immunoprecipitazione della “chaperone” e del suo cliente (Figura 17). Esperimenti atti a dimostrare la possibile interazione di Hsp90 con la frazione microsomiale di Lyn, hanno determinato che la “chaperone” non co-immunoprecipita con la tirosin-chinasi ancorata alle membrane (dati non mostrati).



**Figura 17. Verifica dell'associazione tra Lyn e Hsp90.** Le frazioni del complesso (13 e 14) purificate dopo due gradienti di glicerolo, come descritto in figura 12, sono riunite e suddivise successivamente in aliquote differentemente trattate per 30 min a 4°C in assenza o presenza di 0.1  $\mu$ M GA, 0.1  $\mu$ M 17-AAG, 0.1  $\mu$ M GST/SH3-Lyn, e 0.1  $\mu$ M Peptide Pro-rich, rispettivamente. I campioni sono stati poi soggetti ad immunoprecipitazione con anticorpi anti-Hsp90 e anti-Lyn, e rivelati per la presenza di Lyn e SHP-1L, rispettivamente. I dati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 40 pazienti B-LLC.

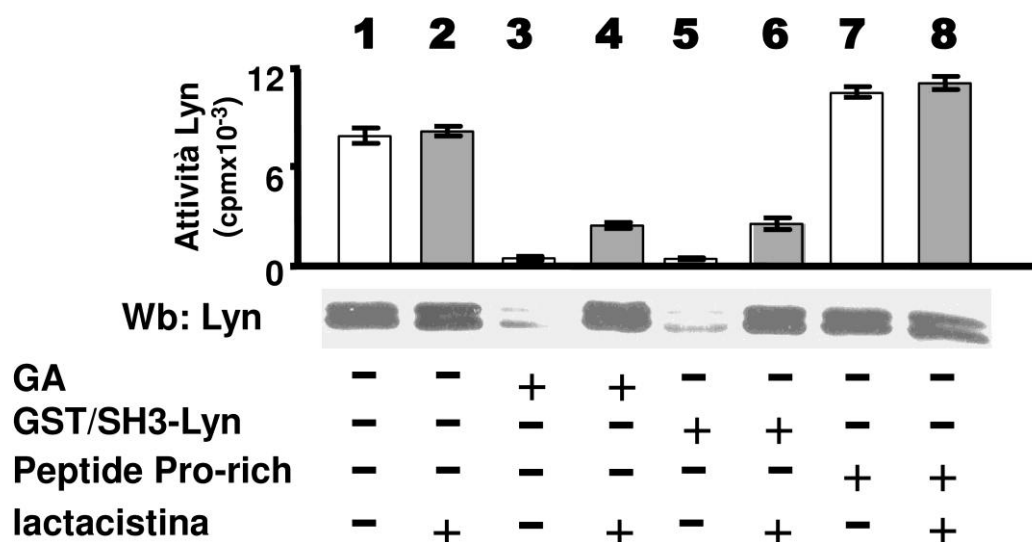
### 3.6 I DOMINI DI Lyn IMPLICATI NELLA FORMAZIONE DEL COMPLESSO CITOSOLICO AGISCONO IN MODO SINERGICO NEL MANTENIMENTO DELLO STESSO.

Per meglio definire i meccanismi che regolano la stabilizzazione del complesso Lyn citosolico, il citosol di 16 pazienti affetti da leucemia linfatica cronica, 8 U-LLC e 8 M-LLC, è stato incubato con composti in grado di destabilizzare le interazioni mediate sia dal dominio SH3 di Lyn (il dominio ricombinante GST-Lyn/SH3 e peptide Pro-rich) che dal dominio catalitico (GA), in presenza e assenza di lactocistina, un inibitore specifico del proteasoma (99). Dopo trattamento, in ciascun campione sono state saggiate l'attività ed il livello proteico di Lyn.

Il dominio GST-Lyn/SH3 e GA inducono degradazione del complesso Lyn rispetto al controllo (Figura 18, comparare colonne 1, 3 e 5).

La presenza di lactacistina, che non causa nessun effetto nel controllo (Figura 18, colonna 2), determina diminuzione dell'attività di Lyn, ma non ne modifica il livello proteico (Figura 18, confrontare colonne 2,4 e 6). Al contrario il trattamento con il peptide Pro-rich stimola l'attività della chinasi nel complesso proteggendola dalla degradazione (Figura 18, colonne 7,8) . Poiché la lactacistina sembra pro-

teggere Lyn dalla degradazione, si è valutato lo stato di associazione tra Lyn, Hsp90, HS1, e SHP-1L mediante immunoprecipitazione anti-Lyn a partire da frazioni citosoliche dopo trattamento con GA e GST/Lyn-SH3 in assenza e presenza di lactacistina (Figura 19).



**Figura 18. La sinergica cooperazione delle interazioni mediate dal dominio SH3 e catalitico stabilizzano il complesso citosolico di Lyn.** Il citosol isolato da cellule leucemiche fresche, è stato trattato in assenza e presenza di 0.1  $\mu$ M GA, 0.1  $\mu$ M GST/SH3-Lyn, 0.1  $\mu$ M Peptide Pro-rich, rispettivamente, ed in assenza e presenza di 10  $\mu$ M lactacistina per 1 h a 37°C. Aliquote di ogni trattamento sono state saggate *in vitro* per l'attività Lyn su peptide Src specifico cdc2(6-20) e rivelazione anticorpale anti-Lyn. I dati sono rappresentativi di esperimenti condotto in triplicato su 16 pazienti B-LLC.

Il trattamento con GA abolisce l'interazione tra Hsp90 e Lyn, lasciando però intatta l'associazione tra il dominio SH3 di Lyn e HS1 e SHP-1L (Figura 19, colonna 3). In parallelo il trattamento con GST/SH3-Lyn distrugge, come atteso, l'interazione con HS1 e SHP-1L, ma determina anche la parziale dissociazione di Hsp90 da Lyn (Figura 19, colonna 4).

Il dominio SH3 di Lyn riconosce sequenze Pro-rich differenti contenute in partner diversi come HS1 e SHP-1L. Ciò permette di affermare che qualsiasi sia il ligando che lega il dominio SH3 di Lyn, si ha stabilizzazione del complesso.

Questi risultati indicano che non è solo Hsp90 che contribuisce a stabilizzare Lyn nel complesso impedendone la degradazione, ma anche l'interazione mediata dal dominio SH3 di Lyn con diversi ligandi gioca un ruolo fondamentale nella stabilizzazione e preservazione del complesso, mantenendo Lyn in conformazione attiva qualsiasi sia il partner contenente la sequenza Pro-rich, come HS1 o SHP-1L.

### Ip: Lyn

Wb: HS1

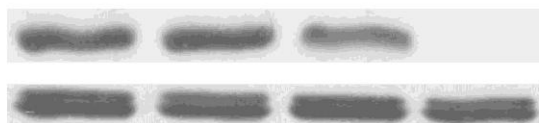
Wb: Lyn



### Ip: Lyn

Wb: SHP-1/1L

Wb: Lyn



### Ip: Lyn

Wb: Hsp90

Wb: Lyn



GA

- - + -

GST-Lyn/SH3

- - - +

lactacistina

- + + +

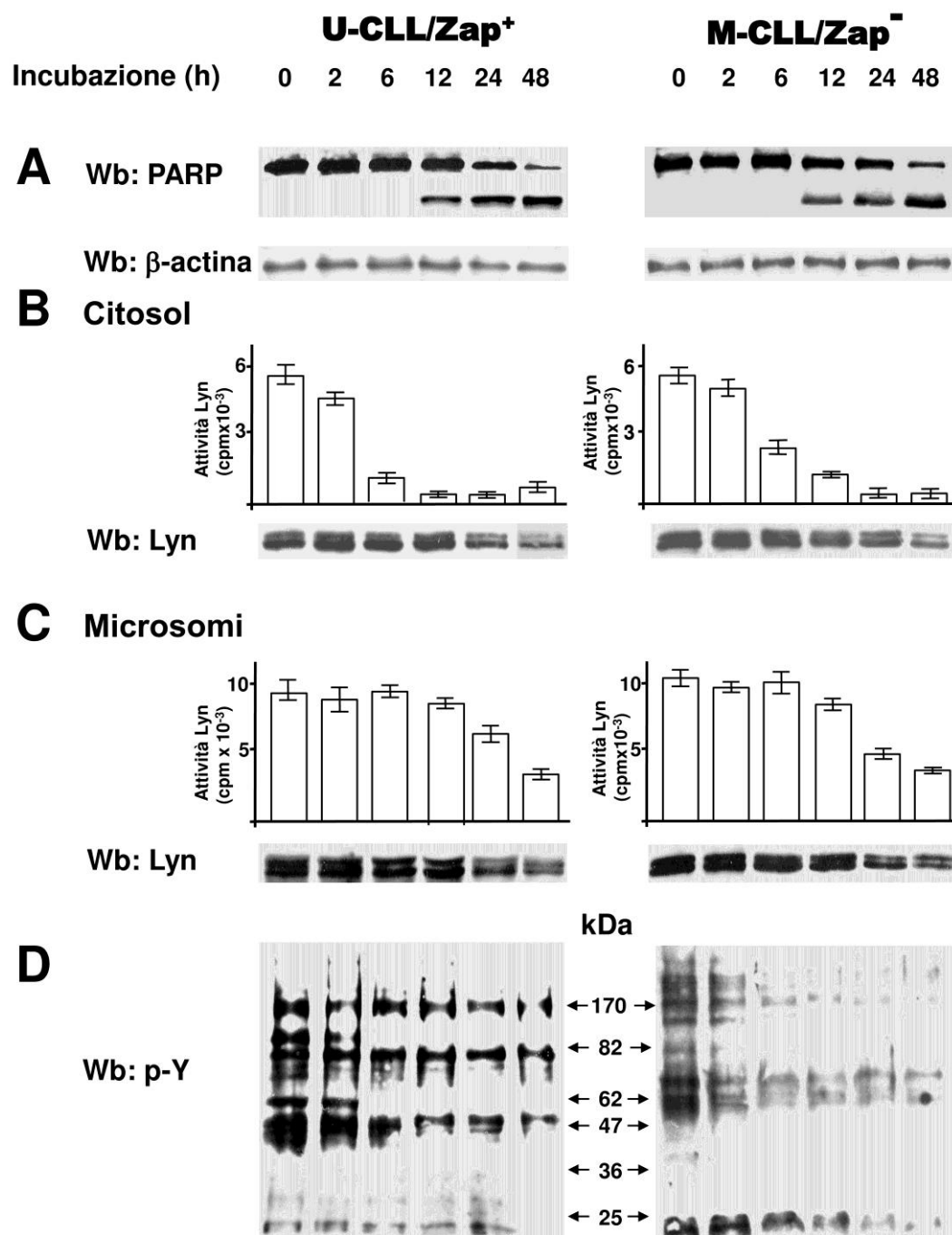
**Figura 19. Verifica delle interazioni presenti nel complesso citosolico di Lyn dopo trattamento con GA e GST/SH3-Lyn in presenza e assenza di lactocistina** Il citosol isolato da cellule leucemiche fresche, è stato trattato in assenza e presenza di 0.1  $\mu$ M GA , 0.1  $\mu$ M GST/SH3-Lyn, 0.1  $\mu$ M Peptide Pro-rich, rispettivamente, ed in assenza e presenza di 10  $\mu$ M lactacistina per 1 h a 37°C. Aliquote di ogni trattamento sono state immunoprecipitate con anticorpo anti-Lyn e gli immunocomplessi sono stati rivelati con anticorpi anti-HS1, anti-SHP-1L e anti-Hsp90. Dopo “stripping” le membrane sono state rivelate con anticorpo anti-Lyn. I dati sono rappresentativi di esperimenti condotto in triplicato su 16 pazienti B-LLC.

### 3.7 IL COMPLESSO CITOSOLICO DI Lyn VIENE DESTABILIZZATO IN PARALLELO ALL'APOPTOSI INDOTTA DA GA.

Poiché è stato dimostrato che il trattamento dei linfociti leucemici con inibitori specifici per l'attività di Lyn ristabiliva l'evento apoptotico (87) e GA è descritta in letteratura come agente in grado di attivare la morte cellulare programmata nella patologia LLC (100), abbiamo esaminato il ruolo del complesso citosolico di Lyn nell'apoptosi indotta da GA.

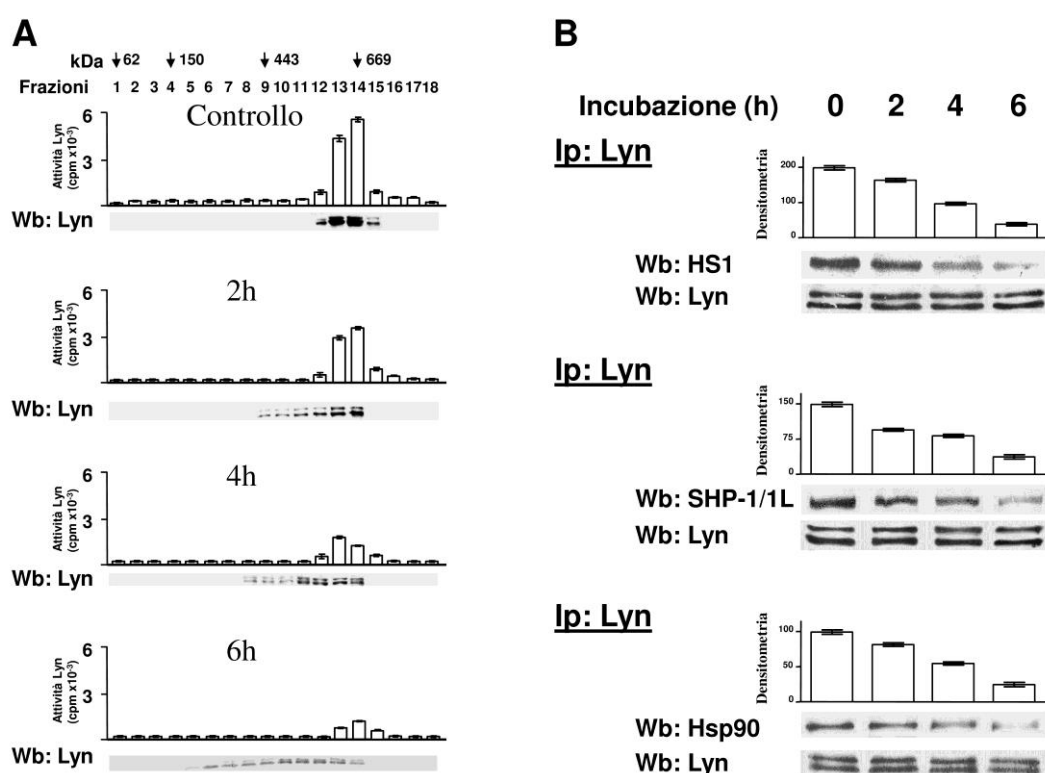
A tal fine, cellule leucemiche sono state incubate in presenza di GA a diversi tempi. La proteolisi di poly ADP-ribose polymerase (PARP-1) che è indice di apoptosi, viene osservato dopo 12h di trattamento con GA, sia nei pazienti U-LLC (pannello a sinistra) che in quelli M-LLC (pannello a destra) (Figura, 20A). Le frazioni citosoliche e microsomiali sono state isolate per ciascun tempo di trattamento e saggiate per l'attività ed il livello proteico di Lyn. Come si nota in Figura 20B, l'attività di Lyn citosolico comincia ad essere inibita dopo 2h di trattamento con GA, raggiungendo un'inibizione dell'80% nelle cellule U-LLC e del 60% nelle M-LLC dopo 6 ore, mentre l'inibizione dell'attività della frazione microsomiale di Lyn viene registrata solo dopo 24h (Figura, 20C). Per entrambe le subpopolazioni di Lyn la degradazione proteica compare solamente dopo 24h. L'effetto di GA sull'attività e la degradazione della frazione microsomiale di Lyn non è diretto ma avviene in seguito all'apoptosi, in accordo con l'ipotesi che Lyn microsomiale non sia associata ad Hsp90 (dati non mostrati). È interessante notare che parallelamente all'inibizione di Lyn citosolico, si ha un decremento del livello basale di fosforilazione tirosinica parallelo al trattamento con GA (Figura, 20D). Poiché è stato precedentemente dimostrato che la Tyr-fosforilazione basale delle cellule B leucemiche è dovuta esclusivamente alla tirosin-chinasi Lyn (87), questo risultato suggerisce che è il Lyn citosolico ad essere direttamente coinvolto nell'incremento della fosforilazione tirosinica basale tipica delle cellule B-LLC.

Abbiamo precedentemente determinato che le interazioni tra Lyn e gli altri partner del complesso citosolico giocano un ruolo chiave nel mantenimento della chinasi in conformazione attiva. Per confermare la nostra ipotesi, le cellule leucemiche isolate da 8 pazienti, 4 U-LLC e 4 M-LLC, sono state sottoposte a trattamento con GA per diversi tempi. Il citosol è stato successivamente isolato e frazionato su gradiente di glicerolo. Ciascuna frazione ottenuta è stata quindi testata per l'attività ed il livello proteico di Lyn. L'analisi dei profili di attività dimostra che l'attività della chinasi diminuisce in parallelo al tempo di trattamento con GA.



**Figura 20. L'apoptosi indotta dal trattamento con GA coinvolge Lyn.** Le cellule di pazienti U-LLC e M-LLC sono state poste in coltura in presenza di 0.1  $\mu$ M GA per diversi tempi. (A,D) Le cellule sono state quindi lisate, sottoposte a Western Blot e rivelate con anticorpi contro PARP, substrato caspasi, e le proteine Tyr-fosforilate. Le membrane dopo "stripping" sono state rivelate con anticorpo anti- $\beta$ -actina come controllo. I pesi molecolari sono indicati al centro. (B,C) Le cellule dopo sonicazione sono state sottoposte a centrifugazione differenziale per separare le frazioni citosolica e microsomiale. Comparabili aliquote delle frazioni sono state saggiate per l'attività di Lyn su peptide Src specifico cdc2(6-20) e analisi Western Blot anti-Lyn. I dati sono rappresentativi di esperimenti condotti in triplicato su 16 pazienti B-LLC.

Questo inoltre determina una distribuzione di Lyn in frazioni corrispondenti a pesi molecolari diversi lungo il gradiente di glicerolo, come evidenziato dalla rivelazione anticorpale anti-Lyn, suggerendo che l'attività del Lyn citosolico è dipendente dalla stabilità del complesso (Figura 21A). A supporto dell'ipotesi del coinvolgimento sinergico dei domini di interazione di Lyn citosolico nella stabilizzazione del complesso, abbiamo immunoprecipitato la tirosin-chinasi dal citosol dei differenti campioni e analizzato la presenza dei vari partner di interazione. La quantità di HS1, SHP-1L e Hsp90 immunoprecipitati con Lyn decresce durante il trattamento con GA (Figura 21B).



**Figura 21. Monitoraggio della degradazione del complesso Lyn durante il trattamento di GA.** Le cellule leucemiche sono poste in coltura come in figura 20. (A) Dopo trattamento il citosol è stato separato e sottoposto a gradiente di glicerolo, come precedentemente descritto. Le frazioni sono raccolte dall'apice e saggate per l'attività di Lyn su peptide Src specifico cdc2(6-20) e analisi Western Blot anti-Lyn. (B) Il citosol isolato come precedentemente descritto è sottoposto a immunoprecipitazione con anticorpo anti-Lyn. Gli immunocomplessi sono rivelati anti-HS1, anti-SHP-1L e anti-Hsp90. Dopo "stripping", le membrane sono rivelate anti-Lyn. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti condotti su 8 pazienti B-LLC.



#### 4. DISCUSSIONE.

Era stato precedentemente documentato che, la tirosin-chinasi Lyn presenta diverse caratteristiche anomale in cellule B-LLC rispetto alle cellule B normali come: livelli proteici superiori; un'attività costitutiva; e delocalizzazione anomala a livello della membrana plasmatica e nella frazione citosolica (87).

I risultati presentati in questa tesi dimostrano che la tirosin-chinasi Lyn partecipa alla formazione di un complesso citosolico multiproteico di circa 600 kDa nelle cellule B di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica. L'inclusione di Lyn in tale complesso potrebbe spiegare il suo anomalo accumulo nel citosol delle cellule leucemiche.

Lyn citosolico, che rappresenta il 30% del totale della proteina, prende parte alla formazione del complesso nella sua conformazione iper-attiva come evidenziato dal suo stato di autofosforilazione a livello della Y396. Tale conformazione è stabilizzata dall'interazione dei domini regolatori di Lyn con ligandi quali Hsp90 attraverso il dominio catalitico, e HS1 e SHP-1L con il dominio SH3. Poiché le funzioni delle SFK sono strettamente regolate da meccanismi molecolari che possono coinvolgere le proteine prima menzionate, abbiamo cercato di comprendere la natura delle interazioni implicate nella formazione del complesso citosolico di Lyn per spiegare le proprietà anomale di questa tirosin-chinasi ed il suo possibile contributo nella patogenesi della leucemia linfatica cronica.

Un nuovo meccanismo di regolazione dell'attività delle SFK si è dimostrato essere il legame tra Hsp90 e le tirosin-chinasi di questa famiglia. Hsp90 infatti lega le SFK stabilizzandole e salvandole dalla degradazione, contrapponendosi al processo di ubiquitinazione (101).

Nelle normali condizioni cellulari, l'associazione di SFK con Hsp90 è difficile da identificare, in quanto il legame che si instaura è a bassa affinità e coinvolge continui cicli di associazione e rilascio tra le due proteine (102).

Nelle cellule tumorali, di recente, è stato riportato che Hsp90 mostra una conformazione attivata, risultando però più sensibile all'interazione con i suoi inibitori (103). Questo incremento di affinità è funzione di un cambiamento conformazionale nel sito di binding dell'ATP di Hsp90 dovuto a delle proteine denominate

“co-chaperone”. In condizioni di normalità, Hsp90 è descritta in forma non attivata e quindi non complessata alle sue “co-chaperone”.

La conformazione chiusa ed inattiva delle SFK è mediata anche dalle interazioni intramolecolari dei suoi domini SH3 e SH2. In letteratura è descritto che il rilascio di un'interazione è sufficiente ad attivare queste tirosin-chinasi in quanto si hanno delle modificazioni conformazionali per cui il dominio catalitico prima inaccessibile si rende disponibile a potenziali interazioni sia con i substrati sia con Hsp90 (38). Infatti, prerogativa dell'interazione SFK-Hsp90 è l'accessibilità al dominio catalitico. Nei nostri esperimenti di immunoprecipitazione del complesso Lyn citosolico isolato da gradiente di glicerolo non abbiamo rilevato la presenza di due “co-chaperone” fondamentali per la formazione del complesso attivato di Hsp90, quali Hsp70 e cdc37 (dati non mostrati). Tale risultato permette di ipotizzare o una diversa capacità di legame della chinasi e della “chaperone” o dei meccanismi di interazione alternativi che contribuiscono sinergicamente alla formazione ed alla stabilizzazione del complesso citosolico di Lyn nella LLC. È ragionevole pensare che la mancanza delle “co-chaperone” nell'associazione di Lyn con Hsp90 sia una caratteristica propria della patologia.

Nel complesso citosolico abbiamo dimostrato che Lyn interagisce mediante il suo dominio SH3 con ligandi che contribuiscono a stabilizzarlo ed a salvarlo dalla degradazione. In particolare, abbiamo individuato un substrato di Lyn quale HS1 ed un regolatore dell'attività della chinasi quale SHP-1L. HS1 gioca un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale mediato dal BCR perché è la prima proteina a fosforilarsi in tirosina in seguito a stimolazione di tale recettore. La fosforilazione di HS1 è sequenziale e prevede una fosforilazione primaria da parte di Syk ed una secondaria da parte della chinasi Lyn, come precedentemente descritto (94). Poiché è stato recentemente dimostrato che HS1 è basalmente Tyr-fosforilata nelle cellule B-LLC (97), abbiamo analizzato lo stato di fosforilazione della proteina nel complesso citosolico, concludendo che HS1 inclusa nel complesso non è Tyr-fosforilata (dati non presentati). Questo ci permette di asserire che in assenza della fosforilazione primaria, HS1 non può diventare substrato Lyn e quindi la parte di proteina associata al complesso non può essere Tyr-fosforilata. SHP-1L è una tirosin-fosfatasi coinvolta nella regolazione del segnale in cellule di origine emato-

poietica e nella regolazione dell'attivazione della chinasi in quanto in grado di defosforilare le tirosine regolatorie delle SFK (23). A questo riguardo, i nostri risultati dimostrano che Lyn inclusa nel complesso citosolico è defosforilata nella Y508 al C-terminale, suggerendo l'ipotesi che tale processo sia mediato da SHP-1L. L'uso di un peptide Pro-rich (KGGRSRLPLPPLPPPG), con una sequenza di binding ottimale per il dominio SH3 di Lyn, elimina le interazioni di Lyn con HS1 e SHP-1L ma non altera la stabilità del complesso, anzi stimola l'attività della tirosin-chinasi. Il legame del peptide al dominio SH3 protegge il complesso dalla degradazione anche in assenza di lactacistina (inibitore del proteasoma) rimarcando il concetto che la stabilità del complesso citosolico è funzione di diversi modi di interazione che sinergicamente ne mantengono l'integrità.

Analoghi risultati sono stati ottenuti dopo trattamento del complesso con GA, inibitore di Hsp90, la quale distrugge l'interazione Lyn-Hsp90 ma mantiene inalterata quella mediata dal dominio SH3.

L'analisi dei dati indica che in cellule B-LLC, la frazione citosolica di Lyn è mantenuta in una conformazione attiva e preservata dalla degradazione (ragion per cui questa cumula nel citosol) non solo dall'interazione con Hsp90, ma anche dall'associazione del dominio SH3 di Lyn con qualsiasi ligando contenente una sequenza Pro-rich.

Abbiamo inoltre valutato la relazione tra lo stato di attivazione di Lyn nel complesso citosolico e l'apoptosi indotta da GA. Dati precedenti avevano dimostrato che l'alta attività basale della chinasi nelle frazioni microsomiale e citosolica era legata alla mancata morte cellulare programmata (87). Il trattamento con GA ci ha permesso di differenziare il contributo delle due sub-popolazioni di Lyn al processo. Il fatto che l'inibizione dell'attività di Lyn citosolico causata da GA sia parallela alla diminuzione dello stato anomalo di Tyr-fosforilazione proteica basale, proprietà caratteristica delle cellule B-LLC, indica che l'attività di Lyn citosolico è funzione della stabilità del complesso. Questi risultati pongono l'accento sul ruolo della frazione citosolica di Lyn nell'anomala Tyr-fosforilazione basale. Confrontando i quadri di Tyr-fosforilazione proteica dei campioni, in cui ZAP-70 è differentemente espressa, si nota che la diminuzione della Tyr-fosforilazione basale indotta da GA ha un andamento simile ed è parallela all'inibizione

dell'attività di Lyn. Questi dati escludono risultati precedentemente pubblicati in cui si dimostrava che i derivati di GA potevano essere considerati potenziali farmaci solamente in pazienti che esprimevano elevati livelli di ZAP-70. Infatti solo in questi pazienti l'inibizione di Hsp90 e la destabilizzazione di ZAP-70 venivano ritenuti capaci di indurre apoptosi nelle cellule B-LLC (104).

Precedentemente era stato dimostrato che il blocco dell'attività di Lyn con l'uso di inibitori specifici contro il dominio catalitico era condizione sufficiente ad indurre apoptosi nelle cellule leucemiche. I dati riportati in questa tesi dimostrano che è solo l'attività del Lyn citosolico responsabile della mancata morte programmata di queste cellule. Quindi è possibile identificare nel Lyn citosolico un potenziale target per lo sviluppo di nuovi farmaci che inibiscano l'attività della chinasi non solo interagendo direttamente con il dominio catalitico, ma anche contrastando le interazioni mediate dai suoi domini regolatori con proteine partner.

I risultati ottenuti in questa tesi sono a supporto dell'ipotesi che un'aberrante attivazione di SFK contribuisce all'insorgenza di malattie tumorali ed identifica nel Lyn citosolico un potenziale target per lo studio di nuovi farmaci che possano indurre l'apoptosi nelle cellule B-LLC.

***Risultati e discussione***  
***Parte Seconda***



## **1. I DISORDINI MIELOPROLIFERATIVI**

### **1.1 Classificazione e caratteristiche generali.**

I disordini mieloproliferativi (DMP) sono delle neoplasie clonali ematopoietiche che riguardano la proliferazione anomala di una o più linee cellulari mieloidi (ad esempio eritrociti, granulociti e megacariociti) (105, 106).

I DMP sono un gruppo eterogeneo di malattie in termini di origine molecolare, coinvolgimento di specifiche linee cellulari e decorso clinico.

In base ai criteri stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità tra i disordini si possono distinguere: la Leucemia Mieloide Cronica (LMC), la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (TE) e la Mielofibrosi Idiopatica (MFI). Vengono incluse in questo gruppo anche malattie meno frequenti come: la Leucemia Neutrofila Cronica (LNC), la Leucemia Eosinofila Cronica (LEC), la Leucemia Mielomonocitica Cronica (LMMC) e la Mastocitosi Sistemica (MS) (105, 107).

LMC, PV, TE e MFI sono caratterizzate da un aumento della proliferazione delle cellule mieloidi con vari gradi di ematopoiesi extramidollare, accompagnata da splenomegalia, trasformazione spontanea in leucemie acute, sviluppo di fibrosi midollare e rischi secondari, ma non trascurabili, di eventi trombotici ed emorragici.

L'ematopoiesi incontrollata, peculiarità comune a tutti questi disordini, è clonale nella LMC, nella PV, nella MFI e, almeno in alcuni casi, anche nella TE (108). La clonalità, considerata un marker per le trasformazioni maligne, è stata verificata mediante analisi di polimorfismi genetici legati al cromosoma X (109) ed altri studi citogenetici. Si è dimostrato che effettivamente i progenitori ematopoietici circolanti sono monoclonali nella maggior parte dei pazienti con DMP, anche se in alcuni casi possono essere policlonali (110) oppure la clonalità può riguardare soltanto una singola linea cellulare (111).

La patogenesi dei DMP coinvolge frequentemente un'attività tirosin-chinasica costitutiva dovuta alla produzione di proteine di fusione o a mutazioni puntiformi.

Tra i DMP, la Leucemia Mieloide Cronica è stata la prima patologia in cui è stata identificata un'anomalia genetica dovuta alla traslocazione cromosomica ricorrente t(9;22)(q34;q11), definita anche come cromosoma Philadelphia (Ph), e codificante per il primo oncogene responsabile della produzione di una proteina di fu-

sione Bcr-Abl con attività tirosin-chinasica costitutiva (112, 113). Poiché in PV, TE e MFI non è stata riscontrata la presenza del cromosoma Ph, queste patologie vengono comunemente denominate anche DMP-non LMC (al momento della diagnosi è quindi da escludere in primis la presenza del cromosoma Ph in quanto i sintomi dei DMP-non LMC sono simili a quelli riportati dai pazienti affetti da LMC).

I DMP-Ph negativi sono caratterizzati da un incremento del numero di cellule mieloidi mature differenziate funzionali. Nel caso della PV questo si traduce in un incremento di globuli rossi nel sangue periferico, nella TE si ha invece un aumento del numero di piastrine legato alla produzione nel midollo osseo di megacariociti. La MFI è caratterizzata dall'aumento del tessuto fibroso nel midollo.

I disordini mieloproliferativi Ph negativi sono di norma difficili da diagnosticare in quanto le patologie sono asintomatiche e la loro scoperta avviene casualmente in seguito ad esempio ad esami emocromocitometrici di routine od al sopraggiungere delle complicanze quali trombosi, fenomeni emorragici o trombo emolitici. Di seguito sono riportati in Tabella 4 i criteri diagnostici relativi alla PV e alla TE, patologie studiate nella presente tesi.

| Criteria | Polycythaemia vera                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Essential thrombocythaemia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Primary myelofibrosis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Major    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Haemoglobin &gt; 18.5 g per dL in men, 16.5 g per dL in women, or other evidence of increased red cell volume*</li> <li>• Presence of JAK2V617F or other functionally similar mutation such as the JAK2 exon 12 mutation</li> </ul>                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustained<sup>d</sup> platelet count of <math>\geq 450 \times 10^9</math> per L</li> <li>• Bone marrow biopsy specimen showing proliferation mainly of the megakaryocytic lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes. No significant increase or left-shift of neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis</li> <li>• Not meeting WHO criteria for polycythaemia vera<sup>d</sup>, primary myelofibrosis<sup>d</sup>, chronic myeloid leukaemia<sup>d</sup>, myelodysplastic syndrome<sup>d</sup> or other myeloid neoplasm</li> <li>• Demonstration of JAK2V617F or other clonal marker, or in the absence of a clonal marker, no evidence for reactive thrombocytosis**</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of megakaryocyte proliferation and atypia<sup>††</sup>, usually accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis, or, in the absence of significant reticulin fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by an increased bone marrow cellularity characterized by granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis (that is, pre-fibrotic cellular-phase disease)</li> <li>• Not meeting WHO criteria for polycythaemia vera<sup>§§</sup>, chronic myeloid leukaemia<sup>§§</sup>, myelodysplastic syndrome<sup>§§</sup>, or other myeloid neoplasm</li> <li>• Demonstration of JAK2V617F or other clonal marker (for example, MPLW515L/K), or in the absence of a clonal marker, no evidence of bone marrow fibrosis owing to underlying inflammatory or other neoplastic diseases<sup>¶¶</sup></li> </ul> |
| Minor    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bone marrow biopsy showing hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis) with prominent erythroid, granulocytic, and megakaryocytic proliferation</li> <li>• Serum erythropoietin level below the reference range for normal</li> <li>• Endogenous erythroid colony formation <i>in vitro</i></li> </ul> | NA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leukoerythroblastosis***</li> <li>• Increase in serum lactate dehydrogenase level***</li> <li>• Anaemia***</li> <li>• Palpable splenomegaly***</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

Nature 2007. 7: 673-683.

**Tabella 4. Criteri diagnostici applicati ai pzienti affetti da DMP.**

Benché eterogenee, PV e TE sono accumulate da due caratteristiche fondamentali: (i) la formazione di colonie eritroidi endogene (EEC, Endogenous Erythroid Colonies); (ii) mutazione ricorrente nella tirosin-chinasi non recettoriale JAK2 (Janus Kinase 2).

Nel primo caso cellule di progenitori eritroidi ottenute dal midollo osseo e dal sangue periferico proliferano *in vitro* in colture contenenti siero ed in assenza di

Epo (114). Approfondimenti successivi hanno dimostrato che non ci sono anomalie nel recettore per l'Epo (115) e che in realtà non si tratta di Epo-indipendenza ma piuttosto di ipersensibilità nei confronti dell'Epo e anche a vari altri fattori di crescita tra cui l'interleuchina 3 (IL-3), il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1) e la trombopoietina (TPO) (116, 117). Queste scoperte suggeriscono quindi l'ipotesi che eventi a valle del legame ligando-recettore siano responsabili della formazione di EEC.

Nel secondo caso, la recente identificazione di una mutazione ha determinato delle variazioni non solo nella diagnosi e classificazione di DMP-non LMC, ma anche nella nuova interpretazione del ruolo assunto da JAK2 nella patogenesi delle malattie mieloproliferative.

## **1.2 Ruolo di JAK2 nella patogenesi dei disordini mieloproliferativi.**

**Struttura e regolazione delle chinasi Janus.** JAK2 è un membro della famiglia delle tirosin-chinasi non recettoriali Janus, cui fanno parte anche JAK1, JAK3 e TYK2 (118, 119). Queste presentano una struttura in domini altamente conservata, partendo dall'estremità N-terminale ritroviamo: (i) il dominio FERM (4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) caratterizzato dalla presenza delle strutture JH3-JH7 (JAK Homology 3-7) responsabile del legame non covalente ai "motivi box 1/2" presenti nella regione citoplasmatica giusta-membrana dei recettori per citochine di tipo I e delle interazioni con altre proteine non recettoriali; (ii) JH2 (JAK Homology 2), dominio pseudochinasico; (iii) JH1 (JAK Homology 1), il dominio chinasico, localizzato all'estremità C-terminale (120).

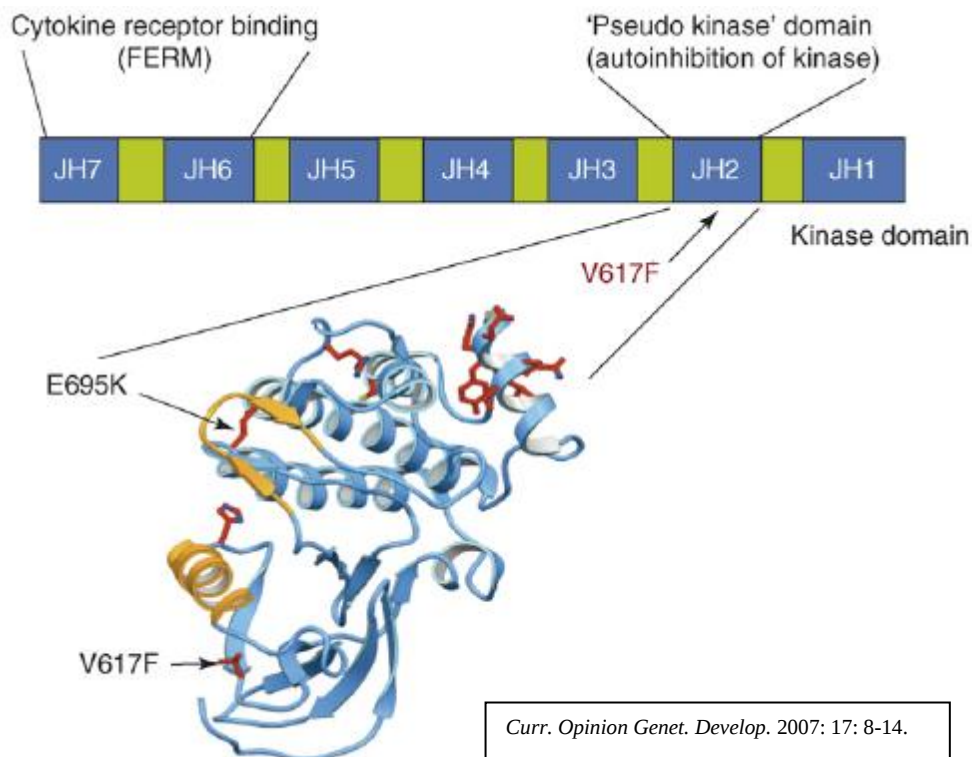
La forma inibita delle chinasi Janus è determinata dalla presenza del dominio JH2 definito come dominio autoinibitorio. Infatti, mentre l'espressione di un dominio JH1 isolato porta ad un'attività costitutiva di JAK2, il costrutto che presenta anche il dominio pseudochinasico JH2 risulta altamente inibito (121). Successivi esperimenti di mutagenesi hanno dimostrato con più evidenza che la regione compresa tra gli aminoacidi 619 e 670 di JH2 è necessaria per l'inibizione di JH1 (122); inoltre le mutazioni di due residui distinti Tyr570Phe e Glu665Lys sempre in JH2, rendono la chinasi costitutivamente attiva (123, 124).

La regolazione negativa delle chinasi Jak è determinata anche dall'evento defosforilativo ad opera delle tirosin-fosfatasi SHP-1 e SHP-2 (119).

Anche le proteine SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling), la cui sintesi proteica è indotta da STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), interagiscono sia con la forma attivata JAK, sia con i residui fosfotirosinici del recettore ad essa associata, impedendo così la propagazione del segnale (125).

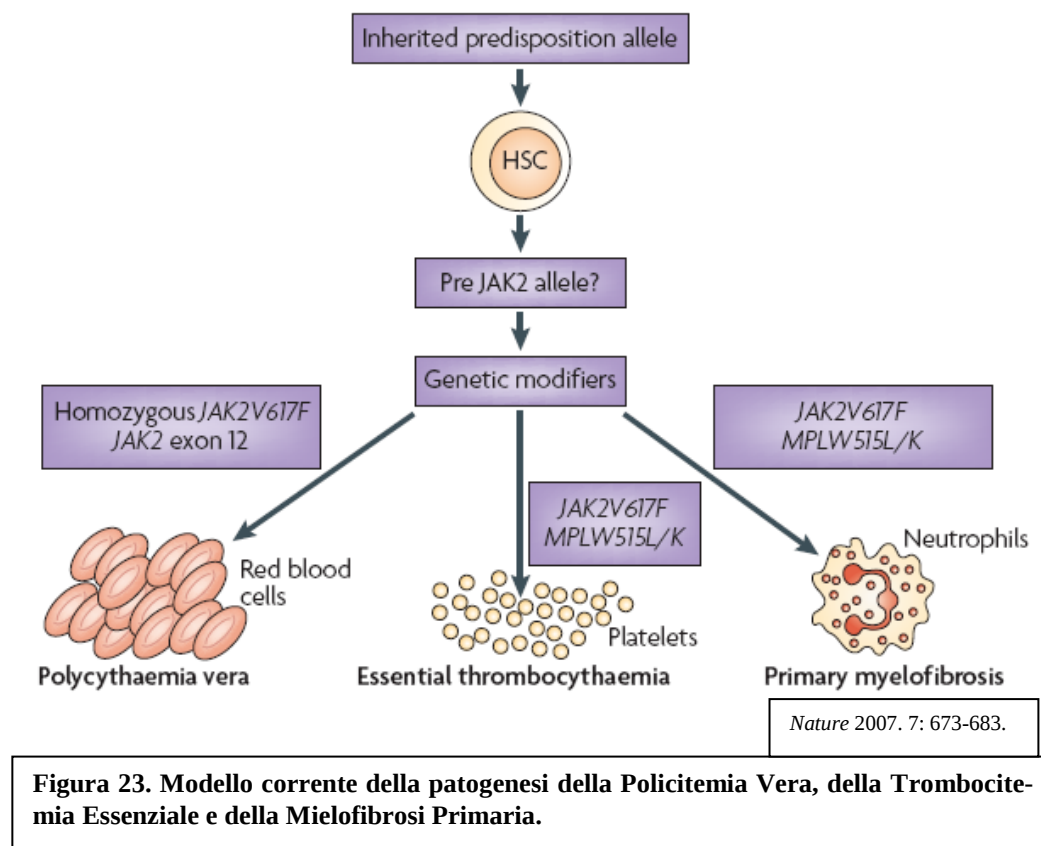
Le chinasi Janus normalmente esprimono la loro attività legandosi ai recettori per le citochine che mancano di attività chinasica intrinseca: l'interazione ligando-recettore determina attivazione di JAK, fosforilazione del recettore, reclutamento e fosforilazione di STAT e conseguente attivazione della trasduzione del segnale (119). Molti recettori per fattori di crescita e citochine utilizzano questa via, come per esempio i recettori per l'interferone (126) ed anche i recettori per citochine ematopoietiche di tipo I (interleuchine, TPO, ecc.) (118).

**La mutazione di JAK2V617F nella PV e nella TE.** Nel 2005, molti gruppi, in modo indipendente, hanno identificato una mutazione ricorrente nella tirosin-chinasi JAK2 in molti pazienti affetti da PV, TE e MFI.



**Figura 22. Struttura di JAK2. Viene evidenziata la mutazione JAK2V617F.**

Questa riguarda la sostituzione di una valina per una fenilalanina in posizione 617 nel dominio autoinibitorio JH2 (Figura 22) (127-131). La mutazione è presente nelle cellule ematopoietiche ma non nel DNA germinale dei pazienti affetti da DMP. A sostegno dell'ipotesi che la mutazione sia somatica e che venga acquisita nell'organo deputato all'ematopoiesi (127, 130). In particolare, la mutazione è frequente nelle cellule staminali ematopoietiche pluripotenti in quanto le proprietà di rinnovamento delle HSC (Hematopoietic Stem Cell) sono necessarie allo sviluppo del fenotipo dei disordini mieloproliferativi, compatibilmente con una trasformazione indotta da un'attività tirosin-chinasica attivata (Figura 23) (132).



La capacità di rinnovamento è invece assente nei progenitori mieloidi. Inizialmente, i dati bibliografici disponibili riportavano che, mentre molti pazienti affetti da DMP erano in condizioni di eterozigosi per l'allele JAK2V617F, un ristretto numero, solitamente PV, presentava una situazione di omozigosi per l'allele mutato (127-130). Studi successivi hanno rivelato che l'omozigosi presente in molti pazienti affetti da PV non è dovuto ad una diminuzione dell'allele wild-type ma piuttosto ad una ricombinazione mitotica e duplicazione dell'allele mutato (127,

130). Questo processo viene denominato disomia uniparentale (UPD, uniparental disomy) e coinvolge il locus 9p24 in cui è incluso anche l'allele JAK2 (130, 134). Mentre l'omozigosi è una caratteristica peculiare della PV, in quanto le EEC derivate dalle cellule di pazienti PV sono in omozigosi per l'allele mutato (135), nella TE la mutazione in omozigosi è più rara, infatti le EEC di pazienti TE sono caratterizzate da alleli wild-type o da JAK2V617F in eterozigosi (136). Queste scoperte suggeriscono che esistano delle differenze genetiche tra PV e TE e che la duplicazione dell'allele mutato sia fondamentale nella patogenesi della PV.

Di seguito è riportata una tabella in cui viene definita la frequenza di mutazione JAK2V617F nei differenti disordini mieloproliferativi (Tabella 5):

| Disease                          | Frequency |
|----------------------------------|-----------|
| Polycythaemia vera               | 81–99%    |
| Essential thrombocytosis         | 41–72%    |
| Primary myelofibrosis            | 39–57%    |
| Chronic myelomonocytic leukaemia | 3–9%      |
| Myelodysplasia*                  | 3–5%      |
| Acute myeloid leukaemia†         | <5%       |

*Nature* 2007, 7: 673–683.

**Tabella 5. Percentuale di frequenza della mutazione JAK2V617F nei DMP.**

La mutazione JAK2V617F determina una attivazione costitutiva della chinasi tanto che il mutante espresso in cellule è costitutivamente fosforilato. Questo si traduce in un'attivazione di alcune vie di trasduzione del segnale che includono STAT, MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) e PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt signaling (127, 137). L'espressione dell'allele mutato conferisce alle cellule ematopoietiche sia ipersensibilità che proliferazione autonoma nei confronti delle citochine (114). In quest'ultimo caso, la chinasi attivata si lega al recettore in assenza del ligando, inducendo un'attivazione della cascata. Sono tre i principali recettori delle citochine ematopoietiche con cui JAK2 associa: EPO-R (Eritropoietin-Receptor) presente nelle cellule eritroidi; c-Mpl (TPO-R) nei megacariociti e GCSF-R (Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor) presente

nei granulociti. La presenza dell'allele mutato potrebbe, almeno in parte, spiegare la differente espressione di questi recettori durante il differenziamento (106).

**In PV e TE alcuni soggetti possono essere JAK2V617F-negativi.** Benché l'allele mutato possa essere presente nella maggior parte dei pazienti affetti da DMP, un numero significativo di casi TE, MFI e in minor numero PV, sono JAK2V617F-negativi. Questi presentano comunque una ematopoiesi clonale, suggerendo l'ipotesi di un'addizionale evento genetico o molecolare coinvolto nella patogenesi dei DMP (138).

Per quanto riguarda i pazienti PV JAK2V617F-negativi, l'analisi di tutti gli esoni coinvolti nel signaling JAK-STAT (quindi JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, STAT5A e STAT5B) ha identificato quattro nuove mutazioni somatiche nell'esone 12 di JAK2: un nuovo allele per una mutazione puntiforme di sostituzione di una lisina con una leucina al codone 539 (K539L), e tre ulteriori alleli derivati da piccole inserzioni o delezioni che coinvolgono i codoni 538 e 543 (139). *In vitro*, tutte le cellule dei pazienti caratterizzati da mutazioni all'esone 12 di JAK2 presentano una spontanea proliferazione in EEC con un meccanismo EPO-indipendente ed un'attivazione del signaling simile a quella descritta precedentemente per l'allele mutato JAK2V617F. Questi dati indicano che alleli differenti, capaci di attivare JAK2, possono essere associati a differenti fenotipi clinici.

L'analisi dei recettori per le citochine prima citati, ha contribuito ad identificare nei pazienti TE JAK2V617F-negativi una mutazione somatica al codone 515 del recettore per TPO MPL (MPLW515L o MPLW515K) (140, 141). *In vitro*, l'espressione di MPLW515L induce attivazione di STAT, MAPK e PI3K-Akt in modo analogo all'allele mutato JAK2V617F. I risultati qui descritti sono a sostegno dell'ipotesi che mutazioni somatiche alternative possano contribuire alla patogenesi dei DMP JAK2V617F-negativi (Figura 23).

Rimane a tutt'oggi da chiarire come una singola mutazione puntiforme sia in grado di dar vita a tre patologie clinicamente differenti. Alla luce delle ultime evidenze sperimentali, è probabile che vi siano delle modificazioni non ereditarie, somatiche ed epigenetiche che influenzano il fenotipo dei DMP.

## **2. PIASTRINE.**

### **2.1 Morfologia e funzioni delle piastrine.**

Le piastrine sono i più piccoli elementi figurati del sangue ed originano nel midollo osseo dai megacariociti. Questi infatti, in seguito ad una proliferazione mitotica non seguita da citodieresi, maturano e rilasciano le piastrine come prodotto finale della protusione del loro citoplasma. Hanno un diametro di 2-4  $\mu\text{m}$  e sono presenti, in condizioni fisiologiche, ad una concentrazione di  $2\text{-}4 \times 10^8$  cellule/ml. Le piastrine sono quindi senza nucleo e senza DNA, mantengono però piccole quantità di RNA e ribosomi, per una pur scarsa sintesi proteica, e contengono numerosi organelli citoplasmatici come liposomi e perossisomi. La loro vita media è di circa 8-10 giorni, al termine della quale vengono rimosse dal circolo sanguigno ad opera delle cellule del sistema reticolo-endoteliale, epatico e splenico.

Al microscopio elettronico le piastrine, nello stato inattivo, appaiono di forma discoidale o lenticolare. In seguito ad attivazione subiscono un cambiamento conformazionale, o “shape change”, per cui assumono una forma globulare con pseudopodi. Lo studio ultrastrutturale al microscopio elettronico ha permesso di comprendere la struttura complessa delle piastrine, identificando quattro zone morfologicamente distinte:

- la membrana plasmatica, ricca di proteine importanti nello scambio di informazioni con l'ambiente esterno e nell'interazione delle piastrine tra di loro (aggregazione) o con la superficie sottoendoteliale (adesione). Tra le proteine di membrana più importanti ci sono le integrine, una famiglia di recettori che comprendono la glicoproteina GPIIb/IIIa (integrina  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ), recettore del fibrinogeno;
- il citoscheletro, costituito da un sistema di microtubuli e filamenti contrattili molto ben sviluppato. Esso forma una speciale impalcatura scheletrica che interviene sia nel mantenimento dell'aspetto discoidale allo stato di riposo, sia nella formazione di pseudopodi durante le prime fasi dell'aggregazione delle piastrine;
- gli organelli citoplasmatici, tra cui si trovano ribosomi, mitocondri, granuli di glicogeno, lisosomi contenenti enzimi ad attività degradativa, numerosi  $\alpha$  gra-

nuli e granuli densi ( $\delta$  granuli). In particolare gli  $\alpha$  granuli sono i più numerosi e contengono fattori della coagulazione, come il fibrinogeno e la fibronectina, proteine tra cui il PDGF (Platelet Derived Growth Factor) con funzione mitogena, il fattore piastrinico 4 e la  $\beta$ -tromboglobulina, entrambi con azione antieparinica, il fattore di von Willebrand, ecc.; i granuli densi contengono cationi bivalenti ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), serotonina e nucleotidi adenilici (ATP, ADP) che, liberati dopo adeguato stimolo, hanno la funzione di potenziare l'attivazione delle piastrine (142). In particolare la serotonina, assunta direttamente dal sangue e immagazzinata nei granuli, potenzia notevolmente la risposta aggregante all'ADP (e altri stimoli deboli) e con la sua attività vasocostrittiva facilita il processo dell'emostasi;

- il sistema tubolare denso, costituito da canalicoli chiusi derivanti dal reticolo endoplasmatico liscio dei megacariociti, rappresenta la principale riserva di calcio intracellulare ed è sede di accumulo di altri componenti plasmatici necessari alla sintesi delle prostaglandine, al metabolismo dell'acido arachidonico ed alla formazione di AMP ciclico.

Le funzioni fisiologiche delle piastrine sono molteplici. Anche se sono altamente differenziate per l'emostasi, queste cellule sono direttamente coinvolte nella risposta immunitaria infiammatoria e antimicrobica. L'emostasi, l'arresto spontaneo dell'emorragia che si verifica in caso di lesione dell'endotelio o di danno vasale, è il processo principale a cui sono deputate le piastrine. L'emostasi consta di una serie di eventi che inizia con una vasocostrizione dei vasi sanguigni lesi, a cui segue l'attivazione e l'aggregazione delle piastrine con la formazione del tappo emostatico, la deposizione del reticolo di fibrina all'interno e attorno al coagulo, la retrazione del coagulo, la sua lisi ed il ripristino della parete.

L'attivazione piastrinica è un processo rapido e finemente regolato e, *in vivo*, non è facile distinguerne le varie fasi perché sono strettamente associate tra loro. L'attivazione *in vitro* consente invece di studiare separatamente tali fasi che si possono suddividere in: adesione, "shape change", secrezione ed aggregazione (143).

## 2.2 Attivazione con trombina

La trombina, molecola centrale nella coagulazione del sangue, è una proteina presente principalmente sulla superficie delle piastrine circolanti, come risultato dell'attivazione proteolitica del suo zimogeno protrombina. Il fattore Xa ed il suo cofattore Va sono gli artefici dell'attivazione della trombina e l'attivazione di Xa, a sua volta, è regolata dal fattore tissutale, una proteina di membrana espressa a livello dei siti di ingiuria vascolare. La trombina attivata partecipa alla formazione del coagulo attraverso la sua attività serin-proteasica, che trasforma il fibrinogeno in fibrina. Il crearsi del coagulo è facilitato anche dall'abilità della trombina di attivare direttamente le piastrine.

I PAR (Protease-Activated Receptor) sono i recettori per la trombina e costituiscono una famiglia di recettori accoppiati a proteine G, che contengono una sequenza nella regione amino-terminale riconosciuta da proteasi (144). Il taglio proteolitico smaschera un nuovo dominio N-terminale che può attivare il recettore tramite interazioni intramolecolari. Questi recettori accoppiati a proteine G possono anche interagire eterotipicamente con altre famiglie di recettori, per dare origine a risposte cellulari appropriate. Il primo esempio di un'interazione di questo tipo è stato descritto tra PAR1 e il recettore per il fattore di crescita epidermico, tipico recettore ad attività tirosin-chinasica (145). Sono ben documentate anche interazioni con le integrine piastriniche e con recettori attivati da proteasi.

### **2.3 Anomalie piastriniche nei DMP.**

Trombosi ed emorragie sono tra le principali complicanze che affliggono i pazienti con DMP e potrebbero essere correlate alle varie anomalie piastriniche descritte in queste patologie (146, 147).

Due prove comunemente utilizzate per valutare la funzionalità piastrinica sono il tempo di coagulazione e gli studi di aggregazione. Il tempo di coagulazione è prolungato in circa il 20% dei pazienti con DMP, provocando conseguentemente una diminuzione nelle risposte di aggregazione. D'altro canto può verificarsi esattamente l'opposto, ossia si possono osservare risposte potenziate, inclusa l'aggregazione spontanea (148). In particolare si è vista una diminuzione nelle risposte d'aggregazione in seguito a stimolazione con agonisti quali ADP, adrenali-

na, collagene e trombossano A<sub>2</sub>. L'aggregazione anormale non appare tuttavia correlata alla coagulazione o a eventi trombotici. Inoltre i pazienti con TE hanno generalmente mostrato tendenza ad avere piastrine con una sopravvivenza inferiore alla media.

Alterazioni nell'aggregazione possono essere provocate da una diminuzione dell'espressione di alcuni recettori sulla superficie piastrinica nei pazienti con DMP. Per esempio si è trovata una sotto-espressione dei recettori per l'adrenalina e per i trombossani (149, 150) ed un'espressione ridotta del recettore per TPO, c-Mpl, è stata riscontrata in pazienti con PV, MFI e TE (151). Come conseguenza della ridotta espressione di c-Mpl si verifica una diminuzione della fosforilazione tirosinica in numerose proteine, in seguito a stimolazione con TPO. C'è da sottolineare che questa anomalia riguarda la risposta alla TPO ma non alla trombina, indicando un'alta specificità dei recettori coinvolti. Anche le integrine, tra cui la glicoproteina IIb/IIIa che lega il fibrinogeno, possono presentare anomalità.



### 3. OBIETTIVI.

La policitemia vera (PV) e la trombocitemia essenziale (TE) sono disordini mieloproliferativi (DMP) clonali caratterizzati da ematopoiesi incontrollata con aumento della produzione di globuli rossi e piastrine, rispettivamente. La complicazione clinica principale in questi due disordini è rappresentata dalla trombosi, anche se in certi casi possono sopraggiungere eventi emorragici. La patogenesi dei DMP coinvolge frequentemente un'attività tirosin-chinasica costitutiva dovuta alla produzione di proteine di fusione o a mutazioni puntiformi (105, 106). Di recente, è stata identificata una mutazione puntiforme nel dominio pseudochinasico della tirosin-chinasi non recettoriale JAK2V617F (127-131). Evidenze sperimentali suggeriscono che la mutazione determini una de-regolazione dell'attività di JAK2, compatibile con un aumentato stato di Tyr-fosforilazione della chinasi. In alcune linee cellulari, come le cellule renali umane T293 (127, 128) e le cellule HeLa (131), dopo over-espressione delle due forme di JAK2, normale e mutata, è stato registrato un aumentato stato di fosforilazione di JAK2 mutata rispetto a JAK2 normale, in parallelo con un'aumentata attività specifica della forma mutata su substrati esogeni. La mutazione, identificata da diversi gruppi di ricerca, è presente con percentuale diversa nei DMP: in media sopra l'80% nei pazienti affetti da PV, attorno al 50% in quelli affetti da TE e in quelli affetti da mielofibrosi idiopatica. Se è certo che questa mutazione ha importanti implicazioni per la classificazione e la diagnosi, non è invece ancora chiaro come questa influenzi l'economia della cellula trasformata, in quanto non esistono ad oggi studi che utilizzino le cellule derivanti da pazienti affetti da DMP.

Come ricordato precedentemente, le complicazioni dei DMP riguardano sia gli eventi trombotici che emorragici. Questi sono dovuti in parte a disfunzioni dell'attività delle piastrine circolanti. Lo studio condotto nel 1998 da Moliterno ed i suoi collaboratori, aveva dimostrato una ridotta espressione del recettore c-Mpl per TPO, il principale fattore di crescita ematopoietico che induce proliferazione e differenziamento nei progenitori ematopoietici dei megacariociti e quindi delle piastrine, ipotizzando anomalie nella trasduzione del segnale mediato da TPO ed una diretta correlazione con la patogenesi della malattia. Durante la stimolazione con TPO di piastrine di pazienti affetti da PV veniva registrata una ridotta fosforilazione tirosinica di JAK2 e del suo substrato STAT5. Questo risultato era del tut-

to inatteso in una malattia caratterizzata da un eccesso di cellule ematopoietiche e da ipersensibilità a fattori di crescita, suggerendo un difetto nel recettore od in uno dei componenti a valle della via di trasduzione del segnale TPO-indotto. In parallelo si era confrontato lo stato di Tyr-fosforilazione di JAK2 e STAT5 durante la stimolazione con trombina determinando un'intatta capacità di segnale trombina-indotto nelle piastrine dei soggetti malati. Partendo da queste considerazioni e ricordando che nella TE l'incidenza della mutazione puntiforme di JAK2 è circa del 50%, e quindi non può avere un ruolo primario nella patologia, noi abbiamo voluto confrontare le vie di trasduzione del segnale attivate dallo stimolo indotto da trombina, in piastrine di soggetti normali e di pazienti affetti da PV e TE.

A questo scopo, sono stati analizzati in questo studio:

- 6 soggetti sani,
- 10 pazienti affetti da PV, caratterizzati da JAK2V617F ed in condizione di omozigosi ed eterozigosi,
- 30 pazienti affetti da TE di cui 15 con JAK2 normale e 15 con JAK2V617F in condizioni di eterozigosi.

Le caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti affetti da DMP sono descritte in tabella 2 nei Materiali e Metodi.

Dopo la stimolazione con trombina è stato valutato, con l'uso di specifici inibitori, lo stato di attivazione delle vie di trasduzione mediate non solo da JAK2, ma anche dalle tirosin-chinasi della famiglia Src, che ricoprono un ruolo importante nel mediare le risposte fisiologiche delle piastrine.

Questo lavoro è stato condotto in collaborazione con il gruppo del Prof. Fabris che ha caratterizzato clinicamente e geneticamente i pazienti, ed il gruppo del Prof. Deana che ha invece isolato le piastrine dai donatori sani e dai soggetti affetti da PV e TE.

## **4. RISULTATI**

### **4.1 CONFRONTO DEL QUADRO TYR-FOSFORILATIVO INDOTTO DA TROMBINA NELLE PIASTRINE DI SOGGETTI SANI ED AFFETTI DA PV E TE.**

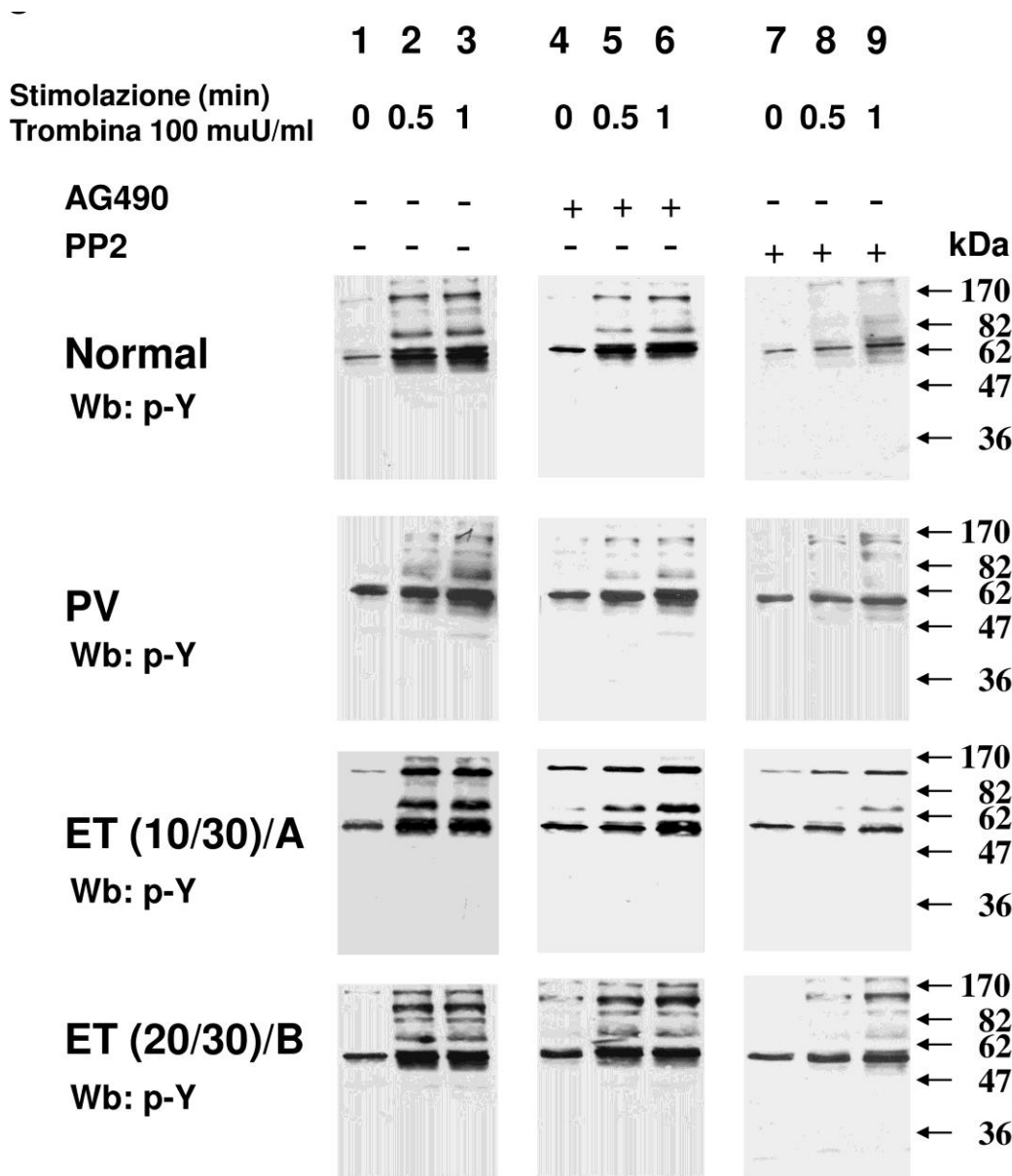
Trombosi ed emorragie sono tra le principali complicanze che affliggono i pazienti con DMP e potrebbero essere correlate alle varie anomalie piastriniche descritte in queste patologie.

Due prove comunemente utilizzate per valutare la funzionalità piastrinica sono il tempo di coagulazione e gli studi di aggregazione. Il tempo di coagulazione è prolungato in circa il 20% dei pazienti con DMP ed è descritta anche una diminuzione nelle risposte di aggregazione in seguito a stimolazione con agonisti quali ADP, adrenalina, collagene, trombassano A<sub>2</sub> e TPO per una diminuita espressione dei rispettivi recettori di superficie (149-151). Al contrario, del tutto regolari si presentano le prove di funzionalità piastrinica dopo stimolo con trombina nei pazienti affetti sia da PV che da TE, probabilmente a ragione della regolare espressione dei PAR, recettori per la trombina. Questo risultato, ottenuto in collaborazione con il gruppo del Prof. Deana, è stato confermato anche nelle piastrine dei pazienti analizzati in questo studio (dati non mostrati). La trombina rappresenta perciò uno stimolo ideale per evidenziare delle anomalie nelle vie di trasduzione mediate da tirosin-chinasi a valle del recettore nelle piastrine di pazienti affetti da PV e TE.

Inizialmente, è stato confrontato il quadro di Tyr-fosforilazione proteica di piastrine isolate da soggetti sani e malati, in condizioni basali e dopo stimolazione con trombina. È stato valutato inoltre il diverso contributo delle due classi di tirosin-chinasi non recettoriali prese in esame, JAK2 e le SFK, con l'utilizzo di due inibitori specifici: AG490 e PP2, rispettivamente. I lisati piastrinici ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali sono stati sottoposti a rivelazione anticorpale anti-fosfotirosina. I dati sono riportati in figura 24.

Come si può notare, in condizioni basali le piastrine dei pazienti analizzati nello studio presentano un lieve aumento del segnale fosfotirosinico rispetto ai soggetti sani come per altro atteso in quest'ultimi (Figura 24, confrontare la colonna 1 dei diversi campioni).

Dopo stimolazione con trombina (100 mU/ml), la rivelazione anticorpale anti-pY mostra una situazione confrontabile tra i diversi campioni (Figura 24, confrontare le colonne 2 e 3 dei diversi campioni). L'utilizzo dell'inibitore specifico per JAK2, AG490, determina una parziale inibizione del segnale fosfotirosinico nei soggetti sani, nei casi di PV e in 10/30 casi di TE ma non in 20/30 casi di TE (Fi-



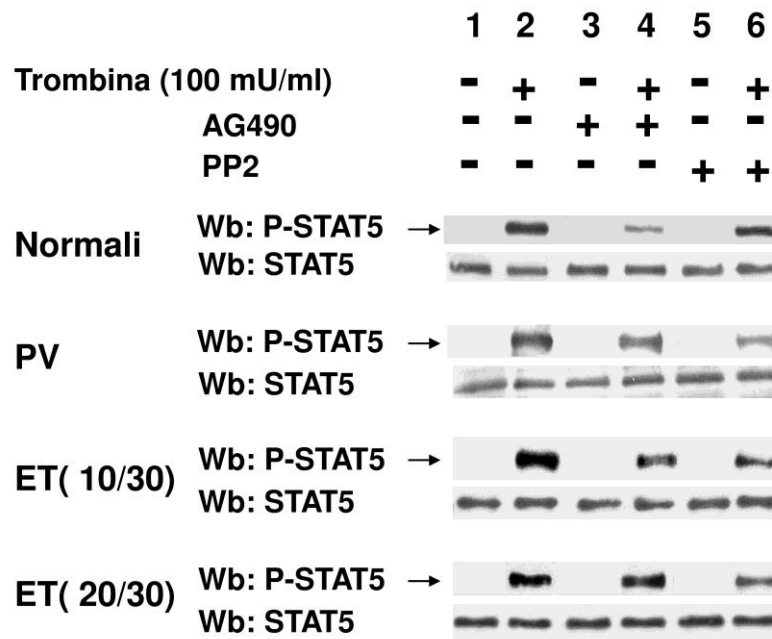
**Figura 24. Analisi del quadro di Tyr-fosforilazione proteica di piastrine stimulate con trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani e affetti da PV e TE sono incubate a 37°C.  $10 \times 10^6$  cellule sono prelevate nei tempi indicati in figura durante lo stimolo con trombina in assenza e presenza di 10  $\mu$ M AG490 e 10  $\mu$ M PP2. I lisati cellulari totali così ottenuti sono sottoposti a SDS/PAGE e rivelati con anticorpo anti-pY. I pesi molecolari delle proteine di riferimento sono indicati a lato. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 6 soggetti sani, 10 PV e 30 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

gura 24, comparare le colonne 2, 3 e 5,6).

Viceversa PP2, inibitore specifico per SFK, annulla drasticamente la risposta all'anticorpo, in tutti i casi presentati (Figura 24, colonne 2,3 e 8,9) mettendo in evidenza il diverso contributo delle due famiglie di tirosin-chinasi in risposta allo stimolo trombina.

#### 4.2 STATO DI FOSFORILAZIONE DI STAT5 IN RELAZIONE ALLA PRESENZA DELLE DIVERSE FORME DI JAK2, NORMALE E V617F, IN PV E TE.

Per determinare la possibile implicazione della mutazione di JAK2 nella differente risposta al trattamento con l'inibitore AG490 durante lo stimolo con trombina, abbiamo determinato lo stato di fosforilazione del substrato di elezione della chinasi: STAT5. I lisati cellulari ottenuti da piastrine quiescenti e stimulate per 1 minuto con trombina, in assenza o presenza di AG490 e PP2, sono stati rivelati con gli anticorpi specifici contro la forma fosforilata di STAT5 (come descritto detta-



**Figura 25. Analisi dello stato di fosforilazione di STAT5 in piastrine stimulate con trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani e affetti da PV e TE sono incubate a 37°C.  $10 \times 10^6$  cellule sono prelevate durante lo stimolo con trombina in assenza e presenza di 10  $\mu$ M AG490 e 10  $\mu$ M PP2. I lisati cellulari totali così ottenuti sono sottoposti a SDS/PAGE e rivelati con anticorpo anti-pSTAT5 e anti-STAT5. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 6 soggetti sani, 10 PV e 30 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

gliatamente in Materiali e Metodi). Successivamente, le membrane sono state rivelate con l'anticorpo specifico per la forma non fosforilata.

I risultati riportati in Figura 25 dimostrano che in condizioni basali lo stato di fosforilazione STAT5 in pazienti affetti da PV e TE è paragonabile a quello di un soggetto sano (Figura 25, colonna 1) e rimane tale anche dopo un minuto di stimolazione con trombina (Figura 25, colonna 2). Il trattamento con AG490 mette in evidenza, invece, che l'inibizione dell'attivazione di JAK2, sia nei soggetti sani che in tutti i malati non è correlata con la completa inibizione del segnale fosfotirosinico associato a STAT5 (Figura 25, colonne 3, 4): risulta infatti parziale nei soggetti sani, nei PV e in 10/30 TE, e non inibito in 20/30 TE.

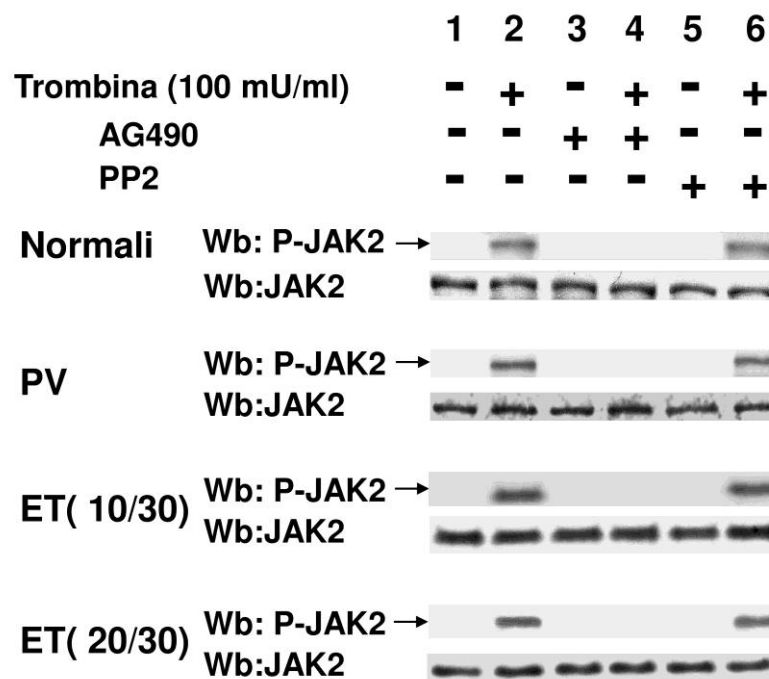
In presenza di PP2, la percentuale di inibizione della fosforilazione di STAT5 nei soggetti sani è molto minore che non nei malati di PV e TE. Tale risultato ci permette di ipotizzare il possibile coinvolgimento delle tirosin-chinasi Src nella fosforilazione tirosinica di STAT5 in piastrine di pazienti DMP.

#### **4.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ SPECIFICA DI JAK2 NORMALE E MUTATA E DELL'INIBIZIONE DA PARTE DI AG490.**

In relazione ai dati fin qui mostrati, la mancata inibizione della fosforilazione di STAT5 si è visto inoltre essere indipendente dalla mutazione di JAK2V617F in quanto quasi tutti i pazienti PV (9 su 10) e circa il 50% dei pazienti TE suddivisi nei due sottogruppi presentano l'allele mutato.

Abbiamo ipotizzato che la presenza di STAT5 fosforilata durante il trattamento con AG490 poteva essere da noi valutato come conseguenza della mancata capacità dell'inibitore di agire su JAK2 oppure della presenza di una forma inattiva della chinasi. Per vagliare queste ipotesi, abbiamo analizzato prima lo stato di fosforilazione dei JAK2 in lisati cellulari di piastrine quiescenti e stimulate per 1 min con trombina, con e senza inibitore AG490. Questi sono stati sottoposti a Western Blot e rivelati con l'anticorpo specifico per la forma fosforilata di JAK2. Successivamente gli stessi campioni sono stati rivelati con un anticorpo contro la forma non fosforilata della chinasi.

Come si può vedere in Figura 26, a parità di JAK2 espressa, lo stato fosforilativo della chinasi in piastrine di pazienti affetti da PV e TE non è basalmente misurabi-



**Figura 26. Analisi dello stato di fosforilazione di JAK2 in piastrine stimulate con trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani e affetti da PV e TE sono incubate a 37°C.  $10 \times 10^6$  cellule sono prelevate durante lo stimolo con trombina in assenza e presenza di 10  $\mu$ M AG490 e 10  $\mu$ M PP2. I lisati cellulari totali così ottenuti sono sottoposti a SDS/PAGE e rivelati con anticorpo anti-pJAK2 e anti-JAK2. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 6 soggetti sani, 10 PV e 30 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

le, in accordo con lo stato rilevato nei soggetti sani (Figura 26, comparare la colonna 1 dei diversi campioni), mentre dopo un minuto di stimolazione con trombina, la positività all'anticorpo contro la forma fosforilata ci permette di affermare che JAK2 è attivata sotto stimolo in tutti i pazienti ed inibita dal trattamento con AG490.

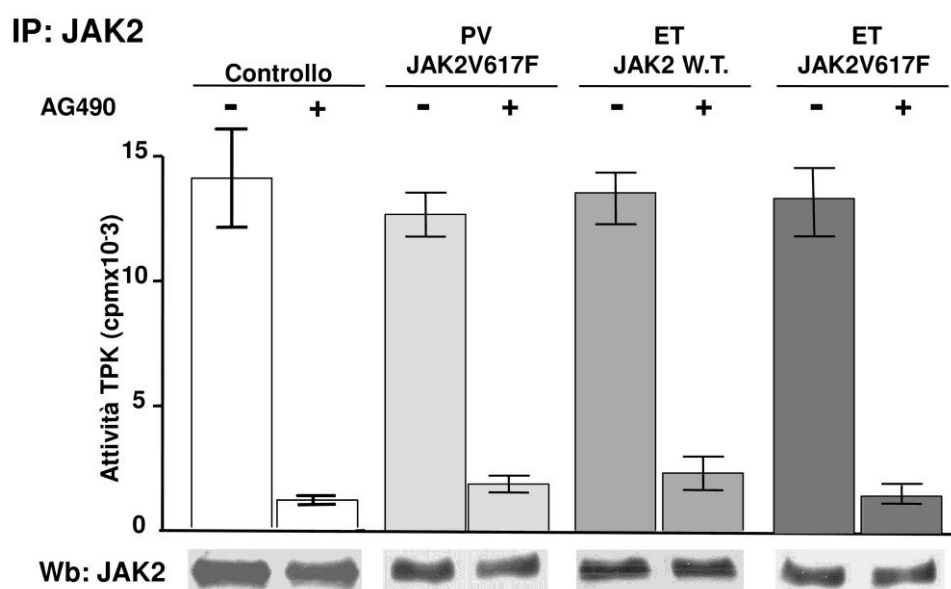
Inoltre, possiamo anche attestare che l'uso di PP2 durante gli esperimenti non determina una inibizione di JAK2 poiché non si verificano delle reazioni incrociate di affinità dell'inibitore SFK per JAK2.

Abbiamo quindi analizzato l'attività specifica di JAK2, normale e mutata, in assenza e presenza di inibitore AG490, allo scopo di verificare la potenziale attività costitutiva della tirosin-chinasi mutata.

A questo scopo piastrine di soggetti sani ed affetti da DMP, incubate a 37°C, sono state stimulate per 1 minuto con trombina, in assenza e presenza di AG490. Successivamente il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con l'anticorpo anti-

JAK2. Sui campioni ottenuti sono stati eseguiti sia il saggio di attività chinastica usando il substrato aspecifico poli(Glu-Tyr)<sub>4:1</sub>, che l'analisi Western Blot per il controllo della quantità di proteina immunoprecipitata. I dettagli metodologici sono riportati nei Metodi.

In relazione all'espressione di JAK2, normale e mutata, abbiamo suddiviso i pazienti in tre gruppi: (i) campioni di PV in cui è espressa solo la forma omozigote mutata di JAK2; (ii) campioni di TE (15) in cui è presente solo JAK2 wild-type; (iii) campioni di TE (15) in cui sono espresse le due forme di JAK2, wild-type e mutata.



**Figura 27. Dosaggio dell'attività di JAK2 in piastrine stimulate con trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani e affetti da PV e TE sono incubate a 37°C in assenza e presenza di 10  $\mu$ M AG490. Al terzo minuto di stimolo con trombina 100 mU/ml,  $80 \times 10^6$  cellule sono prelevate e successivamente lisate. Gli estratti cellulari così ottenuti sono sottoposti ad immunoprecipitazione con anticorpo anti-JAK2. Gli immunocomplessi sono stati utilizzati sia per testare l'attività tirosin-chinasica in vitro su poli(Glu-Tyr)<sub>4:1</sub>, sia per rivelazione anticorpale anti-JAK2, utilizzata come controllo. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti svolti in triplicato su 6 soggetti sani, 10 PV e 30 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

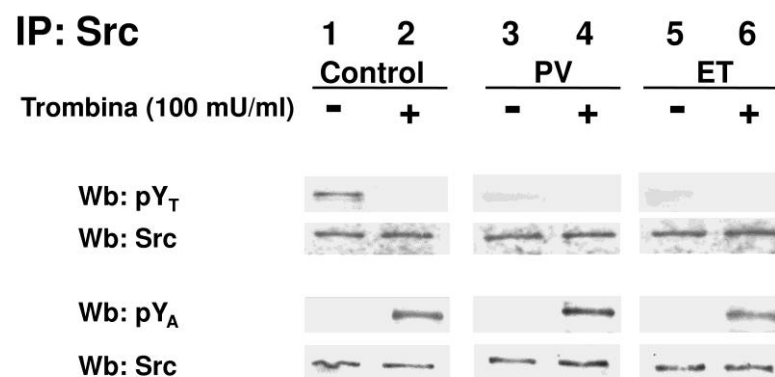
I risultati ottenuti in Figura 27 ci hanno permesso di dimostrare che, a parità di JAK2 immunoprecipitata, l'attività tirosin-chinasica JAK2-specifica, delle forme wild-type e mutata, è simile sia nei soggetti sani che nei malati. Inoltre, in presenza di AG490 si ha un'analogia diminuzione dell'attività JAK2-specifica analizzata.

Questo dimostra che le due forme di JAK2, wild-type e mutata, esprimono la stessa attività specifica potenziale nelle piastrine dei malati affetti da DMP.

#### 4.4 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ TIROSIN-CHINASICA Src-DIPENDENTE IN PIASTRINE DURANTE LA STIMOLAZIONE CON TROMBINA IN SOGGETTI NORMALI E IN PAZIENTI AFFETTI DA PV E TE.

L'elevata percentuale di inibizione della fosforilazione di STAT5, causata dalla presenza di PP2 nei soggetti affetti da DMP analizzati per questo studio ed indipendentemente dalla mutazione di JAK2, mette in evidenza un possibile coinvolgimento delle SFK nei disordini mieloproliferativi.

È ormai assodato che una de-regolazione dei meccanismi di attivazione delle SFK può determinare la comparsa di varie malattie neoplastiche. Poiché il principale meccanismo di regolazione delle SFK è caratterizzato dallo stato di fosforilazione di due residui tirosinici chiave quali la tirosina attivatoria  $Y_A$  (Y416 in Src) e la tirosina inibitoria  $Y_T$  (Y527 in Src), abbiamo cercato di determinare lo stato di fosforilazione dei due residui della chinasi nelle piastrine sia di soggetti sani che di pazienti affetti da DMP.



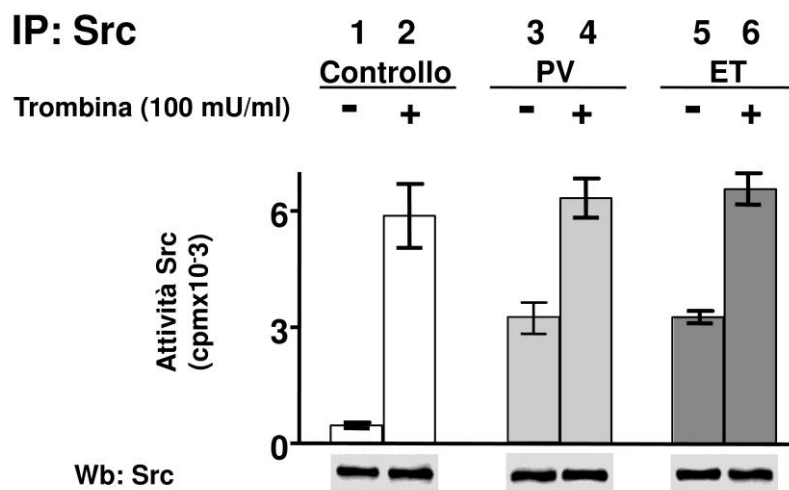
**Figura 28. Analisi dello stato di fosforilazione di Src in piastrine stimulate con trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani ed affetti da PV e TE sono incubate a 37°C. Prima e dopo lo stimolo con trombina 100 mU/ml per un minuto,  $80 \times 10^6$  cellule sono prelevate e successivamente lisate. Gli estratti cellulari così ottenuti sono sottoposti ad immunoprecipitazione con anticorpo anti-Src. Gli immunocomplessi sono stati testati per rivelazioni anticorpali anti-pY<sub>T</sub>, anti-pY<sub>A</sub> e anti-Src. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti svolti su 6 soggetti sani, 10 PV e 30 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

I lisati cellulari ottenuti da piastrine quiescenti o stimulate per 1 minuto con trombina sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-Src, la tirosin-chinasi della famiglia Src più espressa nelle piastrine (8). Gli immunocomplessi purificati sono stati rivelati con anticorpi fosfo-specifici che riconoscono le due forme fosforilate di Src: quella inibita per mezzo dell'anticorpo anti-pY<sub>T</sub> e quella attivata mediante l'uso di anti-pY<sub>A</sub>. Successivamente, le membrane sono state rivelate con l'anticorpo specifico per la forma non fosforilata.

I risultati riportati in Figura 28 indicano che in condizioni basali, a parità di Src espressa ed a differenza dei soggetti sani, nei soggetti affetti da PV e da TE non vi è positività all'anticorpo anti-pY<sub>T</sub>. Risulta invece, come atteso, negativa l'immunorivelazione contro la forma attivata della chinasi compatibile con uno stato non completamente attivato dell'enzima in tutti i campioni saggiati.

Dopo stimolazione in tutti i casi esaminati il livello di pY<sub>A</sub> è statisticamente uguale. I risultati ottenuti sono a sostegno dell'ipotesi che in piastrine quiescenti dei pazienti DMP Src si trovi in uno stato non inibito.

Per tale motivo abbiamo valutato anche l'attività tirosin-chinasica specifica prima e dopo stimolazione con trombina.



**Figura 29. Dosaggio dell'attività di Src in piastrine stimulate con trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani e affetti da PV e TE sono incubate a 37°C. Prima e dopo un minuto di stimolo con trombina 100 mU/ml,  $80 \times 10^6$  cellule sono prelevate e successivamente lisate. Gli estratti cellulari così ottenuti sono sottoposti ad immunoprecipitazione con anticorpo anti-Src. Gli immunocomplessi sono stati utilizzati sia per testare l'attività tirosin-chinasica in vitro sul peptide Src specifico cdc2(6-20), sia per rivelazione anticorpale anti-Src, utilizzata come controllo. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti condotti in triplicato su 6 soggetti sani, 10 PV e 30 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

Sugli immunoprecipitati di Src ottenuti da lisati cellulari di piastrine di soggetti sani e malati è stata saggiata l'attività tirosin-chinasica in presenza di un substrato specifico per SFK come cdc2(6-20).

I dati riportati in Figura 29 mostrano che in condizioni basali, l'attività tirosin-chinasica Src-dipendente quasi assente nelle piastrine controllo è invece già elevata nei pazienti affetti da DMP. In condizioni di stimolazione invece, l'attività chinasica registrata è simile in tutti i campioni saggiati.

Questi risultati confermano i precedenti, descrivendo una Src in stato pre-attivato in piastrine quiescenti isolate da pazienti DMP.

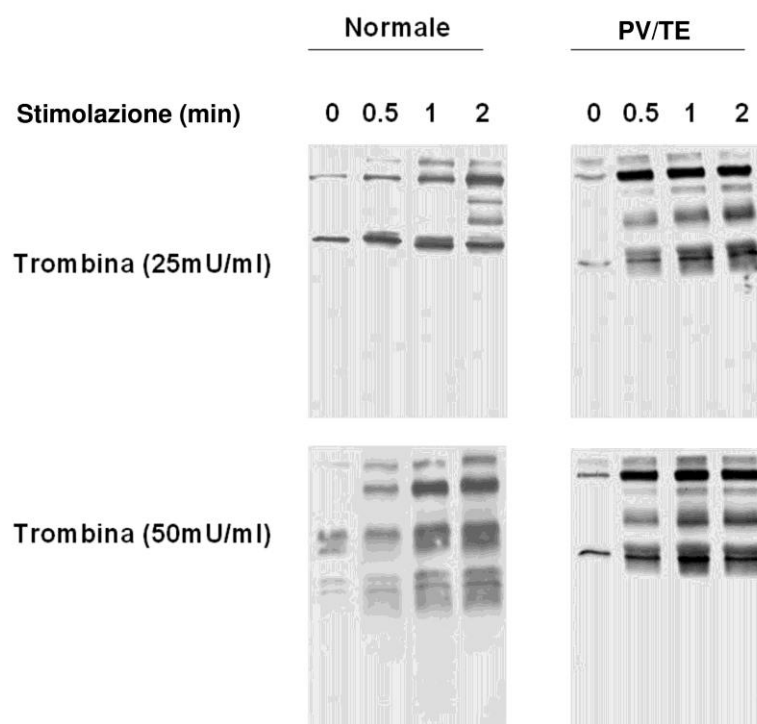
#### **4.5 ANALISI DELLA Tyr-FOSFORILAZIONE DURANTE LA STIMOLAZIONE A BASSE CONCENTRAZIONI DI TROMBINA.**

Molti studi hanno suggerito l'esistenza *in vivo* di un'iper-attivazione piastrinica in soggetti affetti da PV e TE. L'evidenza sperimentale ha dimostrato che nel sangue periferico di questi pazienti le piastrine presentano le classiche variazioni morfologiche tipiche della cellula attivata. Infatti si sono trovate ricche in pseudopodi (extroflessioni citoplasmatiche) e presenti in numerosi aggregati. Le cause di questa attivazione non sono ad oggi conosciute, anche se possono essere ricercate nella variazione del numero di piastrine circolanti, differenti espressioni dei recettori, rilascio di granuli densi, difetti nella mobilitazione del calcio, interazioni con leucociti e cellule dell'endotelio (148).

Alla luce di queste scoperte e del fatto le piastrine dei pazienti affetti da PV e TE presentano, come prima descritto, una Src pre-attivata abbiamo indagato circa la possibilità che queste cellule potessero essere stimulate ad una concentrazione inferiore di trombina rispetto a quella finora utilizzata. Dopo stimolazione i lisati cellulari di piastrine di soggetti normali e malati sono stati sottoposti a Western Blot e rivelazione anticorpale anti-pY.

Come si può notare in Figura 30, già a 25 mU/ml di trombina le piastrine dei pazienti DMP presentano un'attivazione precoce rispetto ai soggetti sani, confermando che queste cellule anche in condizioni di *ex vivo* mantengono una certa iper-sensibilità agli stimoli.

Al fine di determinare se questa risposta precoce alla stimolazione con trombina potesse essere effettivamente correlata con la pre-attivazione di Src e non con l'attività JAK2, normale e mutata, abbiamo monitorato lo stato di fosforilazione non solo di JAK2 e STAT5, ma anche di un substrato dell'attività di Src che



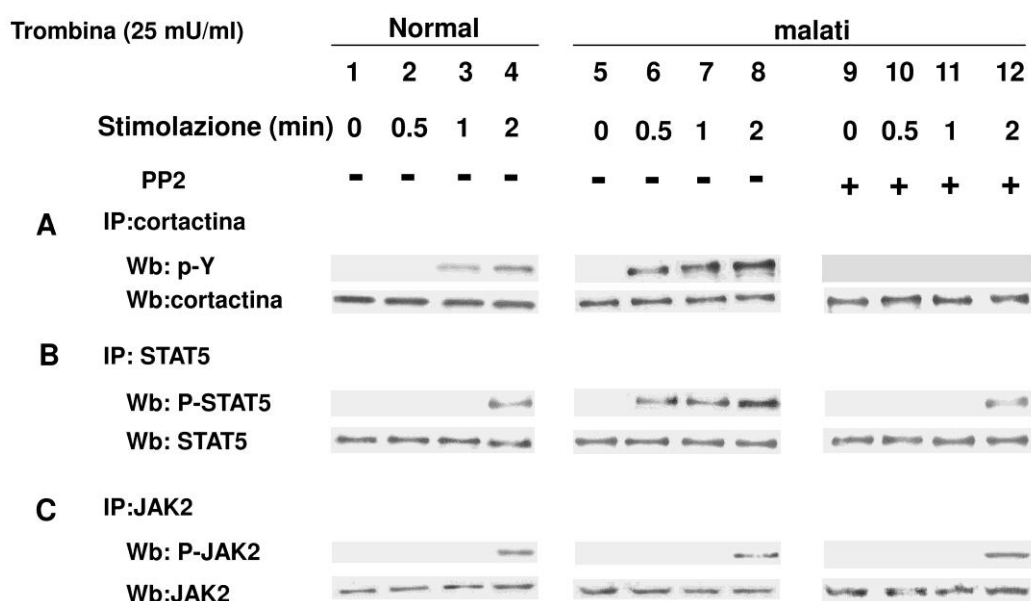
**Figura 30. Analisi della Tyr-fosforilazione proteica in piastrine stimulate con diverse concentrazioni di trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani e affetti da PV e TE sono incubate a 37°C.  $10 \times 10^6$  cellule sono prelevate nei tempi indicati in figura durante lo stimolo con 25 e 50 mU/ml di trombina. I lisati cellulari totali così ottenuti sono sottoposti a SDS/PAGE e rivelati con anticorpo anti-pY. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti condotti in triplicato su 6 soggetti sani, 10 PV e 30 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

sappiamo essere correlato al rimodellamento citoscheletrico caratteristico delle piastrine attivate: la cortactina (152).

Dopo stimolazione con trombina 25 mU/ml, le piastrine di soggetti sani e malati sono state lisate. Si sono successivamente eseguiti degli esperimenti di immunoprecipitazione anti-STAT5, anti-JAK2 e anti-cortactina. I campioni così ottenuti sono stati rivelati sia contro la forma fosforilata sia quella non fosforilata delle proteine in esame.

Come possiamo notare in Figura 31, solo nelle piastrine dei pazienti, a basse concentrazioni di trombina, si ha fosforilazione sia di cortactina che di STAT5 ad opera della tirosin-chinasi Src (Figura 31, confrontare le colonne 1-4 e 5-8), come

confermato dall'inibizione dello stato di fosforilazione dei due substrati in presenza di PP2 (Figura 31, confrontare le colonne 5-8 e 9-12). Queste evidenze sperimentali sono a conferma che le piastrine dei malati DMP sono iper-sensibilizzate anche *ex vivo*, ma dimostrano inoltre che, a basse concentrazioni di trombina, la fosforilazione di STAT5 dipende quasi esclusivamente da Src poiché la tirosin-chinasi JAK2 si stimola a tempi molto più elevati rispetto a quelli registrati per Src (Figura 31, confrontare 5-8 e 9-12).



**Figura 31. Analisi dello stato di fosforilazione di STAT5, JAK2 e cortactina in piastrine stimulate con 25 mU/ml di trombina di soggetti sani ed affetti da PV e TE.** Le piastrine dei soggetti sani e affetti da PV e TE sono incubate a 37°C in assenza e presenza di 10  $\mu$ M PP2.  $80 \times 10^6$  cellule sono prelevate nei tempi indicati in figura durante lo stimolo con 25 mU/ml di trombina e lisate successivamente. Gli estratti cellulari totali così ottenuti sono sottoposti ad immunoprecipitazione con l'uso degli anticorpi anti-cortactina (A), anti-STAT5 (B), ed anti-JAK2 (C). Gli immunocomplessi ottenuti sono rivelati con gli anticorpi per le forme fosforilate e non di cortactina, STAT5 e JAK2. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti condotti in triplicato su 2 soggetti sani, 4 PV e 10 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

#### **4.6 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ TIROSIN-FOSFATASICA IN PIASTRINE NON STIMOLATE IN ASSENZA O PRESENZA DI INIBITORI SPECIFICI.**

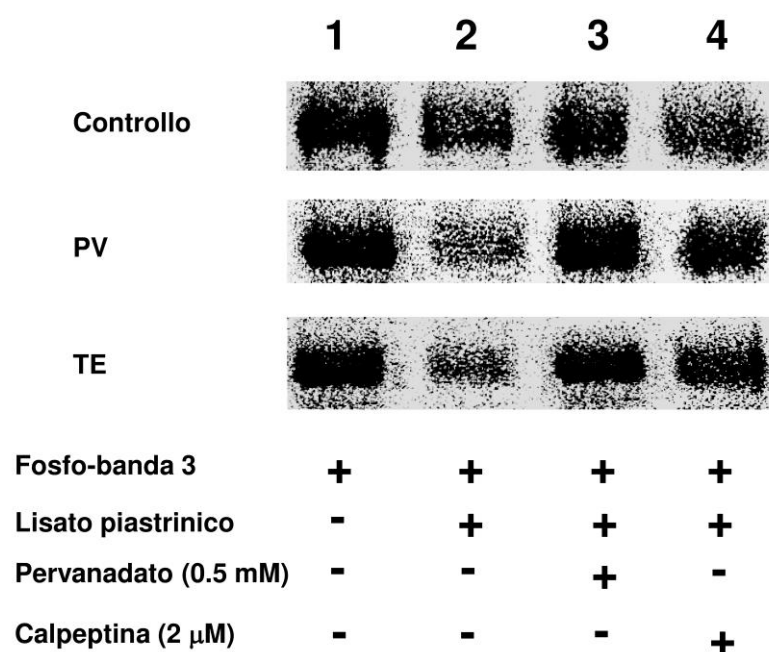
La mancata fosforilazione della  $Y_T$  di Src in condizioni basali nelle piastrine di pazienti affetti da PV e TE, ci ha permesso di ipotizzare che in queste patologie potesse esserci una de-regolazione di un'attività tirosin-fosfatasica.

Anche se le conoscenze sono molto frammentarie e in alcuni casi contraddittorie, alcuni autori avevano già rilevato che le cellule dei pazienti affetti da PV presentano una PTP di membrana con un'attività 2-5 volte più alta rispetto ai soggetti sani. Questa PTP iperattiva è denominata MEG2 (153). L'aumento di attività pare sia dovuto alla distribuzione preferenziale dell'enzima sulla membrana plasmatica. Di norma MEG2 localizza principalmente nel citosol, dove è inattiva, mentre una piccola frazione è associata alla membrana ed è attiva; nei pazienti con PV avviene invece l'opposto. Inoltre, una volta che le cellule si differenziano, i livelli di MEG2 decrescono rapidamente nelle cellule normali, mentre nei malati la velocità di diminuzione è molto più lenta. Non è noto se questa fosfatasi sia capace di defosforilare  $pY_T$  delle SFK.

Le tirosin-fosfatasi che si conoscono defosforilare la tirosina C-terminale delle SFK sono state descritte precedentemente nell'introduzione e sono SHP-1 e SHP-2.

SHP1, è stata considerata un candidato ideale per la patogenesi dei DMP, in quanto esercita un ruolo negativo sulle vie di trasduzione del segnale cellulare, legando i recettori per citochine e inattivandoli mediante defosforilazione (119). Per di più i topi "motheaten", che alla nascita presentano una mutazione di SHP1 con perdita di funzione, esibiscono un'incrementata proliferazione di tutte le cellule ematopoietiche (154). Purtroppo però studi su pazienti affetti da PV non hanno evidenziato alcuna mutazione del gene codificante per SHP1 e nessuna anomalia significativa nell'espressione proteica (155). Su questo punto ci sono tuttavia contraddizioni, poiché un altro studio, che ha analizzato progenitori eritroidi purificati, ha dimostrato che vi è una diminuzione della quantità proteica di SHP1 in ragione ad un decremento del m-RNA in circa il 60% dei pazienti con PV presi in considerazione (156).

Anche SHP2, potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi dei DMP. Contrariamente a SHP1, SHP2 è pressoché ubiquitaria e si pensa che partecipi come modulatore positivo nella trasduzione del segnale. SHP2 è fondamentale nella via di trasduzione iniziata da citochine e fattori di crescita, e mutazioni nel gene che la codifica (PTPN11) sono associate a diverse patologie umane. Tra queste malattie sono note la sindrome di Noonan, causata nel 50% dei casi da mutazioni di SHP2 e la leucemia mielomonocitica giovanile (JMML), in cui SHP2 è mutata nel 20-25% dei casi. Considerando che queste mutazioni generano un enzima iperattivo e che SHP2 svolge un ruolo cruciale nell'ematopoiesi, è concepibile un suo coinvolgimento nei DMP. Fino ad ora tuttavia nessuno studio è riuscito a dimostrare questo.



**Figura 32. Saggio di attività fosfatase su estratti piastrinici non stimolati di soggetti sani ed affetti da PV e TE.**  $1 \times 10^6$  piastrine non stimolate di soggetti sani ed affetti da PV e TE sono incubate a 37°C per 1 minuto in assenza e presenza di substrato banda 3, previamente fosforilato con  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . L'incubazione è effettuata in assenza e presenza di 0.5 mM pervanadato e 2 μM calpeptina. I campioni ottenuti sono sottoposti a SDS/PAGE e la radioattività incorporata è quantificata su Instant Imager Packard. I dati qui mostrati sono rappresentativi degli esperimenti condotti in triplicato su 2 soggetti sani, 2 PV e 6 TE. I dettagli sperimentali sono descritti in materiali e metodi.

Sapendo che SHP-2 è in grado di defosforilare la tirosina C-terminale di SFK, abbiamo allestito delle prove in vitro per saggiare l'attività fosfatase delle piastrine dei soggetti malati DMP in condizioni basali. A questo scopo è stata saggiata la capacità di de-fosforilare la banda3, proteina di membrana degli eritrociti, prima

fosforilata in modo sequenziale dalle tirosin-chinasi Syk e Lyn nelle quattro tirosine: Tyr8, Tyr21, Tyr356 e Tyr904. Ad eccezione della Tyr356 che presenta un intorno idrofobico è stato dimostrato che Tyr8, Tyr21, e Tyr904 sono inserite in sequenze acide e rappresentano siti ideali per l'azione di SHP-2 (64). La prova è stata eseguita anche in presenza di un inibitore di tirosin-fosfatasi aspecifico, pervanadato, e di un inibitore specifico per SHP2, calpeptina. Gli esperimenti sono stati condotti su 2 soggetti sani, 2 malati di PV e 6 malati di TE.

I dati riportati in Figura 32 mostrano che nei soggetti malati l'attività fosfatasica è aumentata rispetto ai sani e questo aumento è inibito sia da pervanadato 0,5 mM sia, anche se in misura minore, da 2 $\mu$ M calpeptina (Figura 32, comparare colonne 2,3 e 4). Questo dato, seppur preliminare, è a sostegno dell'ipotesi che in condizioni patologiche possa esserci un aumento dell'attività fosfatasica SHP-2-dipendente in grado di giustificare lo stato defosforilato di Src nelle piastrine dei pazienti DMP.

## 5. DISCUSSIONE.

La policitemia vera (PV) e la trombocitemia essenziale (TE) sono disordini mieloproliferativi (DMP) clonali caratterizzati da ematopoiesi incontrollata con aumento della produzione di globuli rossi e piastrine, rispettivamente. La complicazione clinica principale in questi due disordini è rappresentata dalla trombosi, anche se in certi casi possono sopraggiungere eventi emorragici. In queste patologie, inoltre, è stata di recente evidenziata una mutazione puntiforme nel dominio pseudochinasico della tirosin-chinasi JAK2V617F. Mentre la mutazione assume importanti implicazioni per la classificazione e la diagnosi, non è ancora chiaro come questa possa invece influenzare l'attività della chinasi nella cellula trasformata e come possa comunque svolgere un ruolo primario nella patologia visto che nella TE l'incidenza della mutazione è del 50% (80% nella PV).

Viste le premesse e poiché le complicanze cliniche principali nella PV e nella TE sono i fenomeni trombotici, abbiamo ricercato anomalie nei membri delle vie di trasduzione del segnale a valle dei recettori. A questo scopo abbiamo utilizzato uno stimolo fisiologico come la trombina, la cui azione si è vista essere regolare nelle prove di funzionalità *ex vivo* delle piastrine, di soggetti affetti da PV e TE (dati non mostrati). L'analisi del quadro fosfotirosinico, dopo stimolazione con trombina, delle piastrine di tutti i pazienti analizzati per questo studio è stato confrontabile con quello dei soggetti sani. Al contrario la presenza di due inibitori specifici AG490 per JAK2 e PP2 per la famiglia Src ci ha permesso di determinare un diverso contributo delle due classi di tirosin-chinasi allo stimolo con trombina. Mentre l'utilizzo dell'inibitore specifico per JAK2, AG490, determina una parziale inibizione del segnale fosfotirosinico, PP2, inibitore specifico per SFK, annulla quasi completamente la risposta all'anticorpo. Per determinare la possibile implicazione della mutazione di JAK2 nella differente risposta al trattamento con AG490, durante lo stimolo con trombina, abbiamo determinato lo stato di fosforilazione del substrato di elezione della chinasi JAK2: STAT5. In condizioni basali non registriamo un'attivazione costitutiva di STAT5 dovuta alla presenza dell'allele mutato in JAK2 (151, 157). Al contrario, il trattamento con AG490 evidenzia che, sia nei soggetti sani che in tutti i malati DMP, l'inibizione dell'attivazione di JAK2 non correla con la completa inibizione del segnale fosfo-

tirosinico associato a STAT5. Il confronto tra piastrine esprimenti JAK2 wild-type e mutata ha inoltre dimostrato che il differente stato di fosforilazione di STAT5 è indipendente dalla mutazione di JAK2 V617F. In accordo con questi dati, gli esperimenti di immunoprecipitazione di JAK2 da piastrine di malati affetti da PV e TE, stimulate con trombina in presenza e in assenza di AG490, hanno dimostrato che le due forme di JAK2, normale e mutata, esprimono la stessa attività specifica.

L'elevato grado di inibizione della fosforilazione di STAT5 in presenza di PP2 ha messo in evidenza un'anomalia nelle vie di trasduzione del segnale mediate dalle tirosin-chinasi Src nelle piastrine dei pazienti affetti da DMP. L'attività Src saggiata sul peptide specifico cdc2(6-20) ci ha permesso di dimostrare che, in condizioni basali, l'attività Src-dipendente è molto superiore nelle piastrine dei pazienti affetti da PV e TE rispetto ai soggetti sani. Si è quindi ipotizzato che in condizioni patologiche, Src, la tirosin-chinasi della famiglia Src più espressa nelle piastrine (8), presentasse un'anomalia nel meccanismo di regolazione negativa. Poiché lo stato di attivazione dell'enzima è determinato dalla fosforilazione attivatoria del residuo  $Y_A$  e dalla fosforilazione inibitoria del residuo  $Y_T$ , abbiamo dimostrato che, a parità di Src espressa, sia nei soggetti affetti da PV che da TE non si rivela immunopositività all'anticorpo specifico anti-p $Y_T$ . Questi dati sono a sostegno dell'ipotesi che nelle piastrine quiescenti dei soggetti affetti da DMP, Src, defosforilata in entrambi i siti regolatori, si trovi in uno stato non inibito ma preattivato e quindi più sensibile agli stimoli esogeni.

Come riportato in precedenza, molti studi hanno suggerito l'esistenza *in vivo* di un'iper-attivazione piastrinica in soggetti affetti da PV e TE. Quest'anomalia può essere clinicamente correlata con possibili eventi trombotici che avvengono puntualmente a carico di questi pazienti. In funzione dei dati bibliografici e dei risultati ottenuti precedentemente, abbiamo determinato che questo stato di iper-attivazione piastrinica può essere connesso ad uno stato di pre-attivazione di c-Src. Abbiamo quindi analizzato lo stato di fosforilazione di STAT5 e di un substrato classico di Src come cortactina, coinvolto nel rimodellamento citoscheletrico delle piastrine attivate, stimolando le cellule con basse concentrazioni di trombina. I dati ottenuti ci hanno permesso di determinare da un lato che entrambe le

proteine sono substrati dell'attività di Src e dall'altro che, in queste condizioni, l'attività di JAK2 è influente sulla fosforilazione di STAT5 qualsiasi sia la sua condizione rispetto alla mutazione.

La mancata fosforilazione del residuo Tyr527 in condizioni basali nelle piastrine dei pazienti affetti da PV e TE fa presupporre una deregolazione dell'attività tirosin-fosfatasi. Dati bibliografici hanno dimostrato che la tirosin-fosfatasi SHP2 è mutata nella sindrome di Noonan e nella leucemia mielomonocitica. Considerando che la mutazione genera un enzima iperattivo e che SHP-2 svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione di Src poiché è in grado di defosforilare la  $Y_T$ , è concepibile il suo coinvolgimento nelle patologie DMP. Grazie all'uso di un inibitore specifico per SHP-2, abbiamo determinato che in condizioni basali le piastrine dei soggetti malati presentano un aumento dell'attività fosfatasi rispetto al normale.

Questi dati, seppur preliminari, sono a sostegno dell'ipotesi che in condizioni patologiche DMP possa esserci un aumento dell'attività tirosin-fosfatasi tale da giustificare lo stato defosforilato di Src.



# ***Risultati e Discussione***

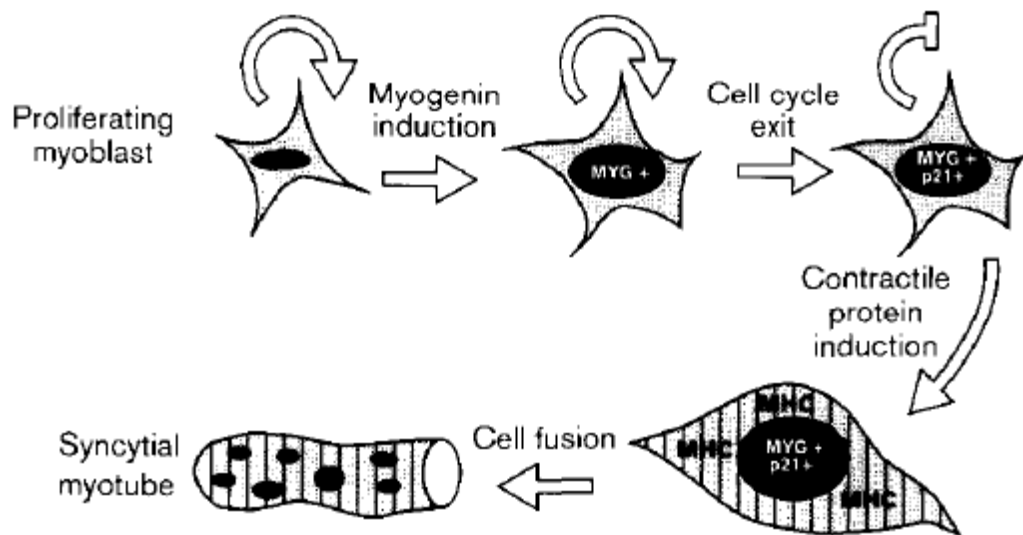
## ***Parte Terza***



## 1.DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE.

Lo sviluppo del muscolo scheletrico è costituito da una serie coordinata di eventi che determinano prima la conversione di cellule del mesoderma pluripotenti in mioblasti, i quali lasciano il ciclo cellulare e differenziano in cellule muscolari che finalmente maturano in fibre muscolari scheletriche.

Come riportato in Figura 33, partendo dalla condizione di mioblasto proliferante, la formazione della fibra muscolare matura è caratterizzata da eventi spazio temporali distinti: (1) espressione dei fattori di trascrizione per geni muscolo specifici; (2) arresto del ciclo cellulare; (3) differenziamento fenotipico con espressione di proteine muscolo specifiche; (4) fusione cellulare con formazione dei miotubi (158).



*Curr. Opinion Genet. Develop.* 1997, 7: 597-602.

**Figura 33. Rappresentazione schematica delle differenti fasi del processo di miogenesi..**

### 1.1 Espressione dei fattori di trascrizione per geni muscolo specifici.

Due sono le famiglie dei fattori di trascrizione identificate: MRF (Muscle Regulatory Factors) e MEF2 (Myocyte Enhancer Factor2).

La famiglia MRF comprende quattro fattori tra cui MyoD (Myogenic Determination), miogenina, myf-5 e mrf4 (Myocyte Regulatory Factor 4).

Questi fattori sono definiti anche bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) per i domini che li costituiscono. I fattori MRF sono in grado di attivare un completo pro-

gramma di differenziamento muscolare quando vengono ectopicamente espressi in cellule non muscolari (159). I fattori MRF attivano la trascrizione legandosi, dopo etero-dimerizzazione con le proteine-E, alle sequenze consenso E-box (CANNTG) presenti in numerosi promotori ed attivatori di geni muscolo-specifici (160). Questi fattori sono espressi nella cellula in una sequenza ben definita: prima Myf-5 e MyoD, quindi miogenina ed infine Mrf4. La successione qui elencata è correlata al ruolo ricoperto nel differenziamento muscolare ed è stata determinata mediante l'analisi di topi know-out: MyoD e Myf-5 stabiliscono la specificità della linea muscolare; la miogenina controlla il processo di differenziamento, Mrf4 è coinvolto nella maturazione dei miotubi (161-163).

I fattori MEF invece, legano una regione del DNA ricca in A/T (CTAW<sub>4</sub>TAG, dove W è una A o una T), adiacente alla regione E-box dei promotori dei geni muscolo specifici. Questi possono così cooperare con i fattori MRF per l'attivazione genica ed il rafforzamento della propria trascrizione (164).

L'associazione dei fattori di trascrizione descritti induce il processo differenziativo, anche se la cellula è ancora in grado di proliferare (165). L'attività di tali fattori può essere inibita da Id (Inhibitor of differentiation). Le proteine Id pur appartenendo alla famiglia HLH mancano della regione basica indispensabile per l'interazione con il DNA ma riescono ad inibire l'attività dei fattori MRF in quanto competono con questi per la formazione di complessi biologicamente inattivi con le proteine-E (166, 167).

**1.2 Arresto del ciclo cellulare.** Lo stato di proliferazione cellulare è legato allo stato di fosforilazione della proteina Rb (retinoblastoma) nel passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Rb è substrato di binding per il fattore di trascrizione E2F durante la fase G1. Quando Rb viene fosforilato sequenzialmente dal complesso cdk4-ciclina D1 (cdk, cyclin-dependent kinase) dissocia da E2F e permette alla cellula di entrare nella fase S del ciclo cellulare (171). L'espressione di ciclina D1 è indotta da fattori di crescita quali FGF (Fibroblast Growth Factor) e TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) ed è massima durante la fase G1 (172). La sua over-espressione accelera la progressione di quest'ultima fase inibendo la trascrizione dei geni muscolo-specifici mediante la fosforilazione di Rb (Figura, 34) (173). L'arresto del ciclo cellulare e l'induzione del differenziamento viene determinata dall'espressione di p21 mediata da MyoD (174). p21 è un inibitore specifi-

co per i complessi costituiti da cdk4 in quanto inibisce l'attività della chinasi interagendo con la subunità che lega la ciclina D (175, 176).

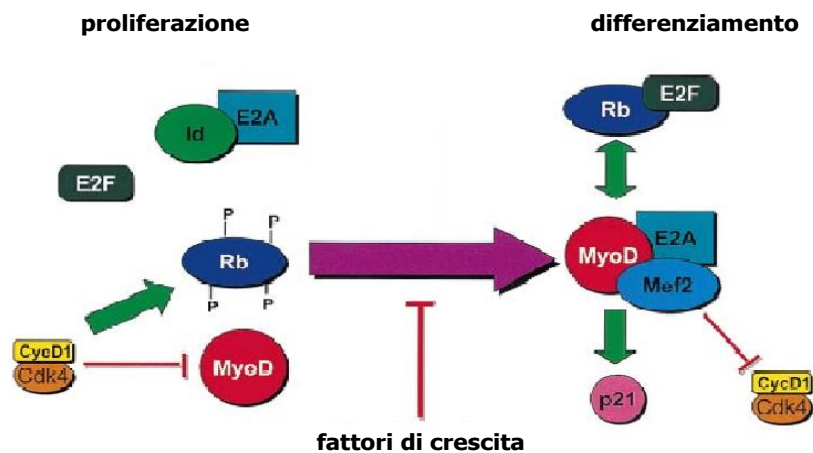


Figura 34. Eventi che caratterizzano la proliferazione e il differenziamento dei mioblasti.

**1.3 Differenziamento fenotipico con l'espressione dei geni muscolo-specifici.** L'arresto del ciclo cellulare indotto dall'espressione di p21 determina il differenziamento fenotipico dei mioblasti. Durante questa fase, i mioblasti sono in grado di esprimere geni muscolo-specifici che codificano per le proteine contrattili: MHC (Myosin Heavy Chain), actina, tropomiosina e troponina. In questa fase le cellule acquistano le caratteristiche morfologiche proprie dei mioblasti differenzianti diventano cioè cellule muscolari di forma allungata.

**1.4 Fusione cellulare e formazione dei miotubi.** L'attivazione del programma di differenziamento porta ad una modificazione del fenotipo cellulare, con la fusione dei mioblasti. Il processo di fusione cellulare procede attraverso due stadi: inizialmente la fusione avviene tra due mioblasti e successivamente altri mioblasti si fondono con questa prima cellula multinucleata. In questo modo si ha la formazione di un sincizio (177).

Affinché le cellule possano fondersi tra loro è necessario che diventino competenti, ovvero che esprimano le molecole necessarie per il processo di fusione. Inizialmente, molecole presenti sulla superficie cellulare mediano l'adesione cellula-cellula e tra queste, anche se con un ruolo non essenziale, sono coinvolti il membro della superfamiglia delle immunoglobuline NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) e le proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti N-caderina ed M-caderina (178). In parti-

colare è stato visto che il  $\text{Ca}^{2+}$  è un elemento necessario nella fusione dei mioblasti e che tale processo sia stimolato da un aumento del calcio intracellulare. Anche se non sono ancora noti i segnali evocati, questa variazione della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare è correlata all'attività della proteasi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente m-calpaina. Questo enzima, la cui espressione aumenta durante il differenziamento muscolare, media la degradazione di proteine della matrice extracellulare e del citoscheletro. Questo evento potrebbe essere necessario per permettere la riorganizzazione del citoscheletro, così da facilitare la fusione tra le membrane dei mioblasti (178).

La formazione del sincizio, che richiede una destabilizzazione transiente della membrana plasmatica delle due cellule che si fondono, è preceduta da un rimodellamento transiente del doppio strato fosfolipidico. Infatti, vi è una ridistribuzione delle proteine di superficie e la formazione di domini arricchiti di lipidi, che sembrano determinare un aumento della fluidità della membrana. Questa modificazione potrebbe generare i siti specifici che mediano la fusione cellulare.

### **1.5 Ruolo delle tirosin-chinasi della famiglia Src nel differenziamento muscolare.**

Evidenze sperimentali recenti hanno mostrato il coinvolgimento delle tirosin-chinasi Src nella proliferazione, nel differenziamento e nella sopravvivenza delle cellule muscolari (179).

Durante il processo di differenziamento di cellule muscolari murine C2C12, i livelli proteici di diversi componenti della famiglia Src e la loro attività catalitica variano nel tempo, seguendo degli andamenti che sono strettamente correlati con i differenti stadi di sviluppo delle cellule muscolari suggerendo una specificità funzionale per le chinasi coinvolte.

Tra le SFK saggiate, due si sono rivelate fondamentali nel corso della miogenesi: Src e Fyn. Nella proliferazione cellulare, è stato dimostrato che Src è over-espressa e iper-attivata. L'uso di PP1, inibitore specifico per Src, determina non solo inibizione dell'attività chinasi ma anche blocco dell'espressione della ciclina D1 ed in parallelo induce un incremento dei livelli cellulari di miogenina, la cui espressione è fondamentale per l'evento differenziativo (180).

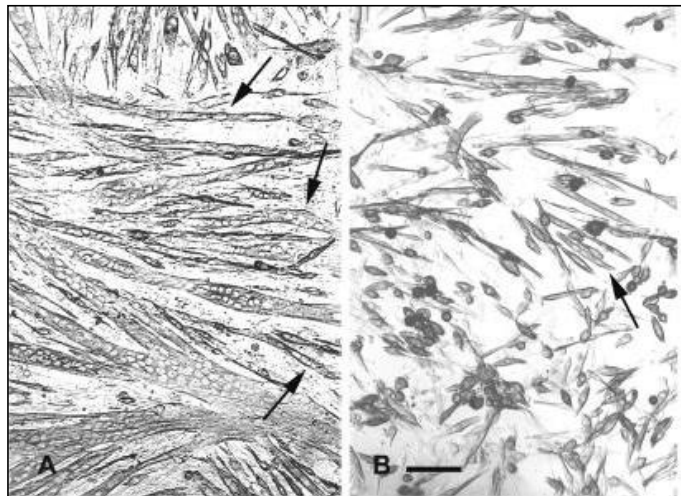
È stato inoltre dimostrato che il differenziamento induce invece l'over-espressione ed iper-attivazione di Fyn. Il trattamento di cellule muscolari mature con PP2 ha messo in evidenza un ruolo primario di Fyn nella sopravvivenza dei miotubi e nella soppressione dell'apoptosi indotta dalla distruzione delle cellule di adesione alla matrice extra-cellulare, così da ritenere che il segnale mediato da Fyn possa modulare il sistema di adesione cellulare merosina-integrina dipendente (181).



## 2. OBIETTIVI.

Il processo di differenziamento muscolare è complesso e finemente regolato. Benché gli eventi che intervengono nella sua realizzazione siano ben caratterizzati, ad oggi non sono ancora state chiarite le cascate di trasduzione del segnale che regolano l'attivazione dei fattori di trascrizione e l'espressione dei geni muscolo-specifici importanti per lo sviluppo del tessuto muscolare maturo. Dati recenti hanno determinato che le SFK potevano svolgere un ruolo fondamentale nel processo di differenziamento.

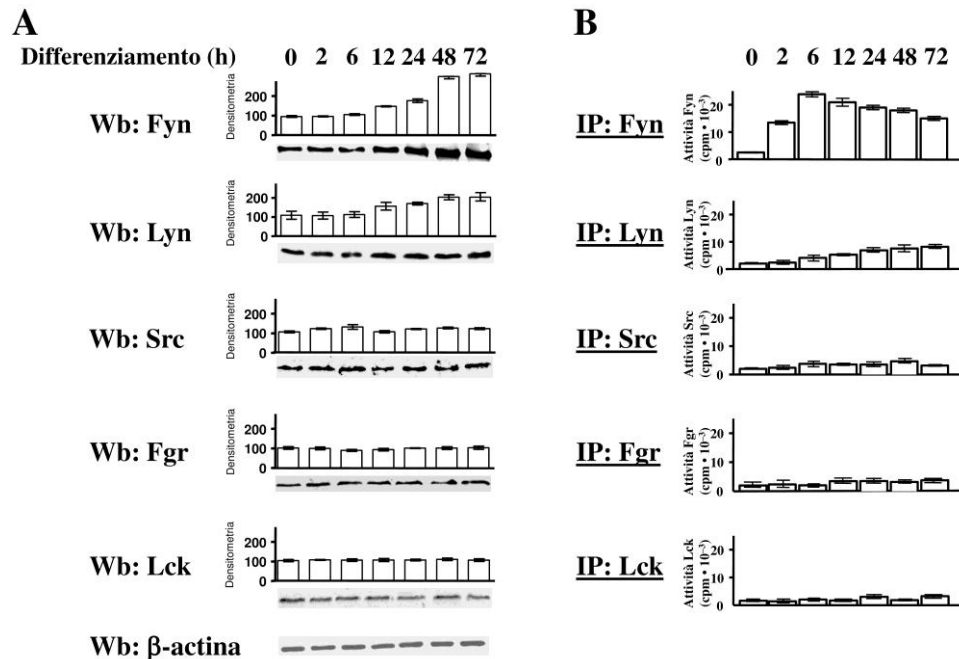
A conferma dell'importanza della Tyr-fosforilazione mediata dalle tirosin-chinasi della famiglia Src nel differenziamento muscolare, esperimenti condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che cellule C2C12 cresciute in terreno differenziativo in presenza di PP2, inibitore selettivo dell'attività SFK, non sono in grado di fondere e formare miotubi (Figura, 35B).



**Figura 35. Effetto dell'inibitore PP2 su cellule C2C12 differenzianti.** Le cellule C2C12 sono state coltivate in terreno differenziativo in assenza (A) e in presenza di 10  $\mu$ M PP2 (B).

Esperimenti successivi ci hanno permesso di confermare che in cellule muscolari C2C12 differenzianti, la tirosin-chinasi Fyn è over-espressa e iper-attivata. In Figura 36A, si evidenzia che a parità di quantità proteica, preso come riferimento l'actina, l'espressione di Fyn incrementa significativamente dopo 12 di differenziamento di circa 3.5 volte rispetto alla condizione di proliferazione, e rimane elevata fino alla formazione dei miotubi multinucleati (48-72 ore). Inoltre, l'analisi dell'attività di Fyn, condotta sul peptide substrato specifico cdc2(6-20), dimostra

che la chinasi viene attivata già alla seconda ora del processo differenziativo con un massimo alla sesta (Figura 36B). Quest'attivazione precede l'aumento della quantità proteica di Fyn, suggerendo quindi l'attivazione di uno specifico meccanismo di regolazione positiva, indotto dalla maturazione muscolare.



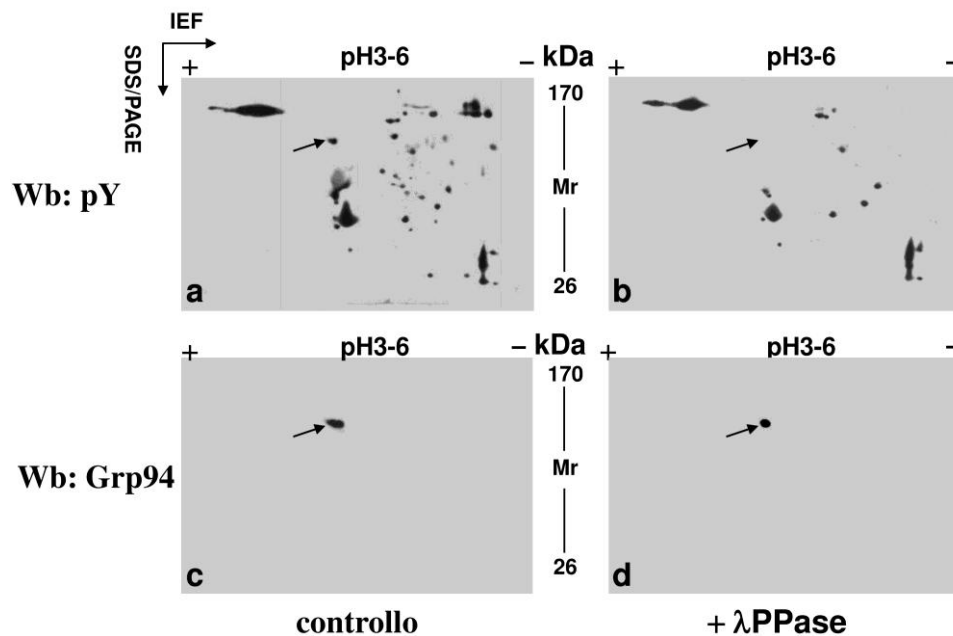
**Figura 36. Monitoraggio dell'espressione proteica e dell'attività di differenti tirosin-chinasi Src durante il differenziamento dei mioblasti.** Cellule C2C12 coltivate in terreno differenziante per i tempi indicati in figura sono lisate. (A) 25  $\mu$ g di lisato cellulare sono sottoposti a SDS/PAGE e rivelazione anticorpale contro gli anticorpi anti-Src specifici riportati o anti- $\beta$ -actina. L'analisi densitometrica è espressa come media della percentuale relativa alla quantità di proteina presente in condizioni proliferanti. I risultati sono relativi a cinque esperimenti separati. (B) In parallelo. I lisati cellulari sono immunoprecipitati con gli anticorpi anti-Src indicati. Sugli immunocomplessi è stata poi saggiata l'attività tirosin-chinasica Src-dipendente su peptide cdc2(6-20) specifico, come descritto dettagliatamente in Materiali e Metodi. I dati riportati si riferiscono ai valori medi calcolati per quattro esperimenti condotti separatamente con S.E.M. indicata dalle barre verticali.

Alla luce di questi risultati preliminari, nel corso del mio dottorato abbiamo analizzato il ruolo della Tyr-fosforilazione mediata dalla Src-chinasi Fyn nel differenziamento muscolare.

### 3. RISULTATI.

#### 3.1 IDENTIFICAZIONE DI SUBSTRATI Tyr-FOSFORILATI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE: Grp94.

Allo scopo di identificare substrati Tyr-fosforilati da Fyn eventualmente coinvolti nel differenziamento muscolare, abbiamo sottoposto ad elettroforesi bidimensionale la frazione microsomiale isolata da cellule C2C12 alla sesta ora di differenziamento, tempo in cui è massima l'attività di Fyn (vedi Figura 36 in Obiettivi). Abbiamo posto la nostra attenzione all'analisi del compartimento sub-cellulare microsomiale in quanto, rispetto ad un lisato cellulare totale, il campione è stato arricchito di compartimenti membranosi cui possono essere ancorate le tirosin-chinasi Src, quali la membrana plasmatica, l'apparato del Golgi ed il reticolo endoplasmatico (ER).



**Figura 37. Identificazione di substrati Tyr-fosforilati durante il differenziamento muscolare.** I microsomi, isolati dopo centrifugazione differenziale da cellule C2C12 alla sesta ora di differenziamento, sono stati suddivisi in due aliquote e trattati in assenza (a, c) e presenza (b, d) di  $\lambda$ PPase. I campioni sono stati quindi sottoposti a IEF e risolti in SDS/PAGE. Dopo Western Blot, si sono eseguite le rivelazioni anticorpali anti-pY e dopo stripping anti-Grp94. La figura è rappresentativa di tre esperimenti separati.

Tra le proteine fosforilate in tirosina evidenziate tramite Western blot con l'anticorpo anti-pY, è stata identificata la proteina-“chaperone” Grp94 sia per punto isoelettrico ( $pI_{Grp94}=4.95$ ) che per risposta anticorpale anti-Grp94 (Figura 37, pannelli a,c). Grp94 (Glucose Regulated Protein 94) è una proteina di 94 kDa che appartiene alla famiglia delle “stress proteins”.

L'analisi delle rivelazioni anticorpali prima descritte, ha evidenziato che il segnale anti-pY si sovrappone solo con la porzione più acida dello *spot* corrispondente a Grp94 facendoci ipotizzare che la percentuale di proteina fosforilata sia solo una frazione rispetto al totale. Infatti, la maggiore mobilità verso l'anodo della frazione Tyr-fosforilata della proteina è dovuta all'addizione di gruppi fosfato che aumentando l'acidità della proteina modificandone il punto isoelettrico.

Per confermare la specificità del segnale fosfotirosinico di Grp94, abbiamo analizzato la frazione microsomiale dopo pre-trattamento con la  $\lambda$ PPase (Figura 37, pannelli b,d). Come atteso, dopo il pre-trattamento con la fosfatasi, la porzione corrispondente a Grp94 (Figura 37, pannello d) non presenta reattività all'anticorpo anti-pY (Figura 37, pannello b) a conferma dell'avvenuta defosforilazione della “chaperone”.

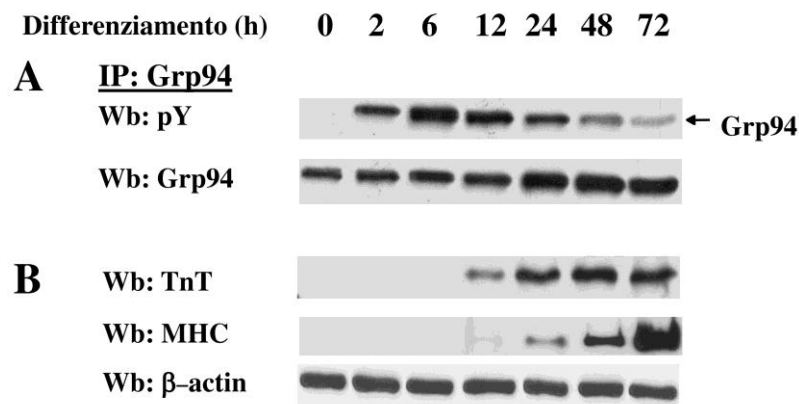
### **3.2 ANALISI DELLO STATO DI FOSFORILAZIONE DI Grp94 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE C2C12.**

In seguito all'identificazione di Grp94 come proteina Tyr-fosforilata durante il differenziamento muscolare, abbiamo analizzato lo stato di fosforilazione della “chaperone” durante l'intero processo.

A questo scopo, lisati cellulari totali di cellule C2C12 proliferanti e differenzianti per diversi tempi sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione con anticorpo anti-Grp94. In seguito i campioni sono stati rivelati con anticorpo anti-pY e anti-Grp94.

Come mostrato in Figura 38, la proteina è Tyr-fosforilata transientemente con un massimo alla sesta ora per poi decrescere lentamente sino al terzo giorno dell'evento. Infatti, sebbene la quantità di proteina espressa aumenti nel tempo in ragione del differenziamento, la frazione di Grp94 fosforilata in tirosina diminui-

sce. Questa evidenza sperimentale può far supporre l'esistenza di un meccanismo regolativo che coinvolge l'azione di tirosin-fosfatasi.



**Figura 38. Tyr-fosforilazione di Grp94 indotta dal differenziamento muscolare in cellule C2C12.** (A,B) Cellule C2C12 vengono lisate a diversi tempi di differenziamento. (A) 100 µg di lisato totale sono immunoprecipitati con anticorpo anti-Grp94. Dopo SDS/PAGE, gli immunocomplessi sono rivelati prima con anticorpo anti-pY e successivamente dopo stripping con anticorpo anti-Grp94. (B) 25 µg di lisato totale sono invece rivelati con anticorpi anti-TnT, anti-MHC e anti-βactina. I dati riportati nei due pannelli sono rappresentativi di quattro esperimenti separati.

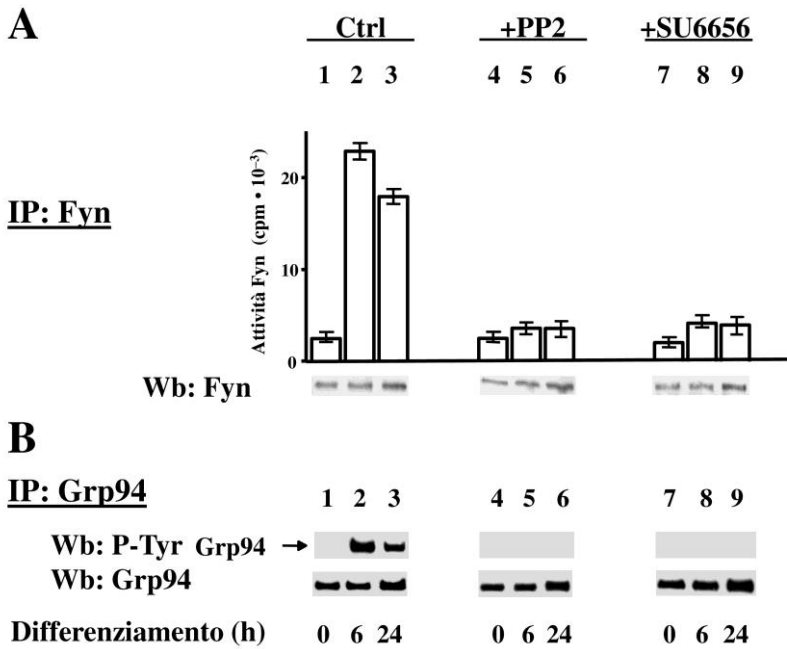
In Figura 38A, è interessante notare che l'evento fosforilativo, assente nelle cellule proliferanti, risulta essere molto precoce, precedendo anche l'espressione di proteine muscolo-specifiche quali la troponina T (TnT) e la catena pesante della miosina (MHC) (Figura 38B).

Per definire se l'attività delle tirosin-chinasi Src fosse responsabile della Tyr-fosforilazione di Grp94, abbiamo aggiunto al terreno differenziativo delle cellule C2C12 inibitori specifici dell'attività di SFK, come PP2 e SU6656. I lisati cellulari totali ottenuti dopo il trattamento sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-Fyn e l'attività chinasi degli immunocomplessi è stata analizzata usando come substrato il peptide Src-specifico cdc2(6-20).

Come si può vedere in Figura 39A (colonne 1-3), mentre in mioblasti proliferanti Fyn è poco attivo, il processo differenziativo induce una stimolazione della tirosin-chinasi che risulta essere massima alla sesta ora per poi decrescere dopo 24 ore. La presenza di PP2 e SU6656 nel terreno differenziativo abolisce fortemente l'attività di Fyn (Figura 39A, comparare colonne 4-6 e 7-9). L'immunoprecipitazione di Grp94 condotta in esperimenti paralleli, ha dimostrato che la fosforilazione della proteina indotta durante il differenziamento è annullata

in cellule C2C12 trattate con PP2 e SU6656 (Figura 39B, comparare colonne 1-3 con 4-6 e 7-9).

Questi risultati suggeriscono indirettamente che la Src-chinasi Fyn possa mediare la Tyr-fosforilazione di Grp94.

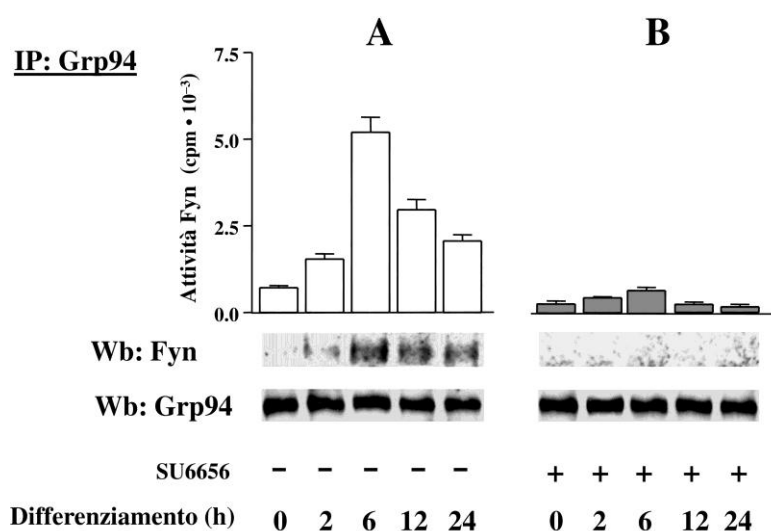


**Figura 39. Effetti degli inibitori PP2 e SU6656 sull'attività di Fyn e la Tyr-fosforilazione di Grp94 durante il differenziamento.** (A) Le cellule C2C12 sono mantenute in terreno differenziativo per i tempi indicati in presenza del solo veicolo (colonne 1-3), 10  $\mu$ M PP2 (colonne 4-6) e 10  $\mu$ M SU6656 (colonne 7-9). 100  $\mu$ g di lisati cellulari totali ottenuti da ciascuna condizione sono immunoprecipitati con anticorpo anti-Fyn. Gli immunocomplessi sono stati utilizzati sia per testare l'attività chinasi in vitro su peptide Src specifico cdc2(6-20) come descritto in Materiali e Metodi, sia per la rivelazione anticorpale anti-Fyn, utilizzata come controllo. (B) I lisati cellulari ottenuti in (A) sono immunoprecipitati con anticorpo anti-Grp94. Gli immunocomplessi sono poi stati rivelati prima anti-pY e quindi anti-Grp94. I dati riportati nei due pannelli sono rappresentativi di quattro esperimenti separati.

### 3.3 Fyn INTERAGISCE E FOSFORILA Grp94 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE C2C12.

Allo scopo di ottenere una prova diretta che la fosforilazione di Grp94 fosse determinata da Fyn durante il differenziamento, abbiamo approntato degli esperimenti di co-immunoprecipitazione di Grp94 da cellule C2C12 proliferanti e differenzianti per diversi tempi in assenza e presenza di SU6656. I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 40. Gli immunoprecipitati anti-Grp94 mostrano positività all'anticorpo anti-Fyn solamente dopo l'induzione del differenziamento (Figura

40A). E' inoltre da notare come l'interazione sia transiente e sia massima alla sesta ora del processo, quando anche l'attività della tirosin-chinasi è massima suggerendo che Grp94 possa interagire solo con la forma attivata della tirosin-chinasi. Tale ipotesi è confermata dall'analisi della presenza dell'attività chinasi saggiata sugli immunocomplessi di Grp94 condotti in esperimenti paralleli. Infatti, la maggiore quantità proteica di Fyn co-immunoprecipitata è presente alla sesta ora di differenziamento, in corrispondenza della massima attività espressa dalla chinasi durante il processo e presente negli immunocomplessi di Grp94 isolati (Figura 40A). Come atteso, la presenza di SU6656 annulla sia la risposta anticorpale anti-Fyn sia l'attività chinasi associate agli immunoprecipitati anti-Grp94 (Figura 40B).



**Figura 40. Fyn in conformazione attiva interagisce con Grp94 durante il differenziamento.** Cellule C2C12 sono mantenute in terreno differenziativo per i tempi indicati in figura alla presenza del veicolo (A) o 10  $\mu$ M SU6656 (B). 100  $\mu$ g di lisati cellulari ottenuti sono immunoprecipitati con anticorpo anti-Grp94 e gli immunocomplessi sono analizzati per attività chinasi in vitro su peptide Src specifico cdc2(6-20) come descritto in Materiali e Metodi (colonne dei pannelli). I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti separati con S.E.M. indicata dalle barre verticali. Immunocomplessi anti-Grp94 ottenuti in parallelo sono rivelati con anticorpo anti-Fyn ed in seguito anti-Grp94. La figura è rappresentativa di tre esperimenti separati.

### **3.4 MIGRAZIONE DI Grp94 DAL RETICOLO ENDOPLASMATICO ALLA MEMBRANA PLASMATICA DI CELLULE C2C12 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO.**

Avendo dimostrato l'interazione diretta tra Fyn ed il suo potenziale substrato Grp94, abbiamo cercato di analizzare il ruolo della Tyr-fosforilazione nella modulazione delle funzioni di Grp94 durante il differenziamento muscolare. Grp94 è una proteina ubiquitariamente espressa che localizza principalmente, ma non esclusivamente, nel reticolo endoplasmatico (ER) come confermato dalla sequenza C-terminale di ritenzione al ER: Lys-Asp-Glu-Leu (182, 183).

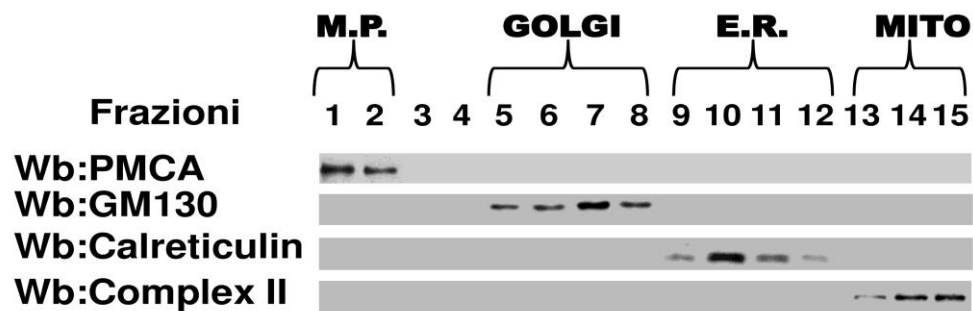
Una tra le molte funzioni attribuite alla proteina è quella di essere coinvolta nel processo di maturazione muscolare. E' stato dimostrato infatti che cellule muscolari murine C2C12 over-esprimono Grp94 durante il differenziamento. Inoltre, mediante la tecnica del cDNA antisense, che determina una marcata riduzione dell'espressione di Grp94, si è evidenziata una mancata formazione di miotubi (cellule muscolari differenzianti polinucleate), causata dalla diminuzione della quantità di Grp94 localizzata sulla superficie cellulare (60). Poiché la fosforilazione proteica è uno dei possibili meccanismi di controllo della traslocazione cellulare di alcune "chaperone" (184, 185), abbiamo ipotizzato che la migrazione di Grp94 alla membrana plasmatica, che avviene nel processo di formazione dei miotubi in cellule C2C12 differenzianti, potesse essere mediata dalla Tyr-fosforilazione Fyn-dipendente. Abbiamo quindi cercato di identificare il compartimento sub-cellulare, in cui Fyn potesse interagire e fosforilare Grp94.

A questo scopo abbiamo analizzato la localizzazione delle due proteine in cellule C2C12 proliferanti e differenzianti mediante separazione degli organelli sub-cellulari su gradiente discontinuo di densità OptiPrep™, come descritto in (65).

La corretta purificazione ed identificazione dei diversi comparti è stata verificata con l'uso di anticorpi che riconoscono proteine localizzate in modo specifico nelle diverse frazioni subcellulari (Figura 41, pannello in alto):

- PMCA, pompa del calcio localizzata nella membrana plasmatica;
- Golgi p58, proteina periferica di membrana localizzata nell'apparato del Golgi;
- Calreticulina, proteina del lume del reticolo endoplasmatico;

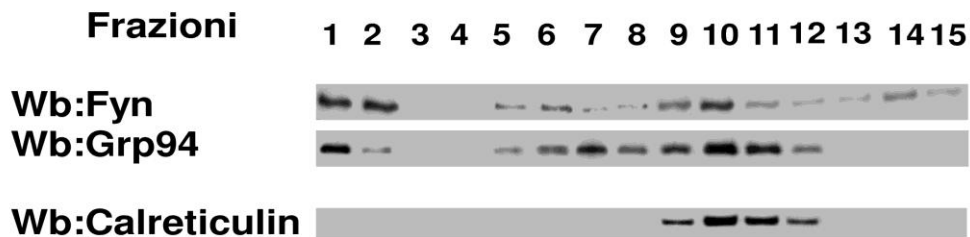
- Complesso II della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri.



## A Proliferazione



## B Differenziamento



## C Differenziamento +PP2

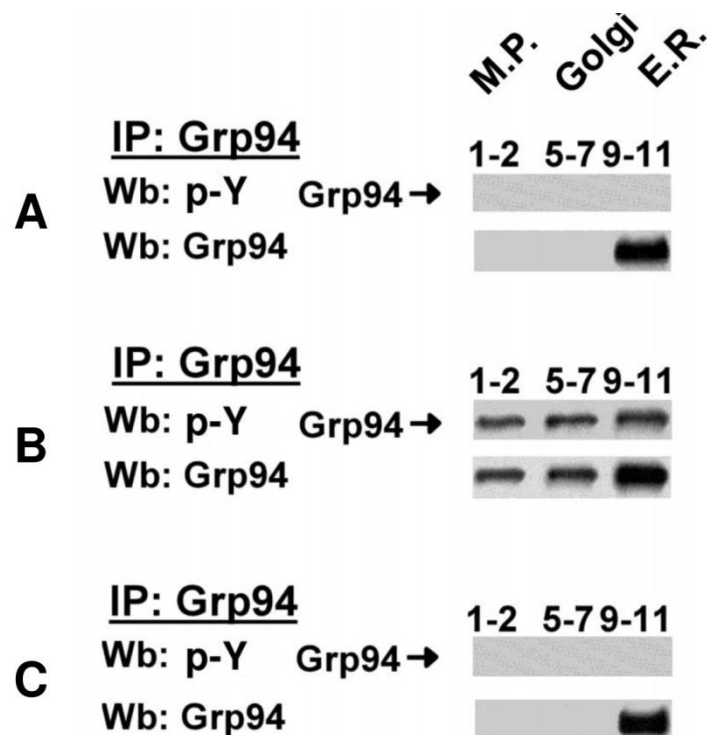


**Figura 41. Localizzazione sub-cellulare di Fyn e Grp94 in cellule C2C12.** Cellule C2C12 sono mantenute in terreno proliferativo (A) o differenziativo per 6h (B,C) in presenza del veicolo (A,B) o 10  $\mu$ M PP2 (C). Le cellule sono quindi sonicate in tampone isotonic e sottoposte a centrifugazione differenziale al fine di separare i nuclei ed il citosol dalla frazione particolata. Questa viene frazionata mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di Optiprep<sup>TM</sup> (10-30%) come descritto in Materiali e Metodi. Le frazioni sono raccolte dal limite superiore del gradiente. Aliquote delle frazioni ottenute sono rivelate con anticorpi organello-specifici: anti-PMCA, anti-GM130, anti-calreticulina e anti-ComplessoII. Altre frazioni vengono invece rivelate anti-Fyn e anti-Grp94. La figura è rappresentativa di quattro esperimenti separati.

Le rivelazioni anticorpali effettuate sulle frazioni del gradiente ci hanno permesso di confrontare la distribuzione della proteina Grp94 e della chinasi Fyn in cellule proliferanti e differenzianti alla sesta ora. I risultati ottenuti mostrano che nelle diverse condizioni sperimentali la tirosin-chinasi Fyn localizza sia sulla membrana plasmatica che in altri compartimenti sub-cellulari tra i quali il ER (Figura 41A,B). Diversa è invece la distribuzione di Grp94: mentre in condizioni proliferanti la proteina si trova esclusivamente nel ER, in condizioni differenzianti Grp94 trasloca dal ER prima nell'apparato di Golgi e sulla membrana plasmatica (Figura 41A,B). L'importanza della fosforilazione tirosinica nella localizzazione sub-cellulare della proteina è dimostrata dalla presenza nel terreno differenziativo dell'inibitore specifico per Fyn quale PP2: in presenza di quest'ultimo la proteina localizza esclusivamente nel ER (Figura 41C).

Per valutare il ruolo della Tyr-fosforilazione nella traslocazione di Grp94, abbiamo approntato esperimenti di immunoprecipitazione anti-Grp94 dalle frazioni corrispondenti ai seguenti compartimenti: membrana plasmatica (frazioni 1-2), apparato del Golgi (frazioni 5-7) e reticolo endoplasmatico (frazioni 9-11) di cellule C2C12 nelle diverse condizioni sperimentali prima descritte. Gli immunocomplessi sono stati quindi analizzati per la presenza di fosfotirosina tramite anticorpo anti-pY. Come mostrato in Figura 42A, in cellule proliferanti Grp94, che è presente solo a livello del ER, non è Tyr-fosforilata. Diversamente, in mioblasti differenzianti la proteina, che come atteso appare nei tre compartimenti analizzati, si presenta ovunque Tyr-fosforilata (Figura 42B). Da notare è il grado di Tyr-fosforilazione di Grp94: il grado di Tyr-fosforilazione della proteina presente nell'apparato del Golgi e nella membrana plasmatica è più elevato di quello presente nel ER suggerendo che la traslocazione di Grp94 sia mediata dalla Tyr-fosforilazione. Tale ipotesi è stata confermata dalla presenza di PP2 in cellule C2C12 differenzianti dove la mancata Tyr-fosforilazione della "chaperone" impedisce la migrazione della proteina dal ER (Figura 42C).

Questi dati indicano che la fosforilazione tirosinica di Grp94, dipendente dal processo di differenziamento dei mioblasti, avviene a livello dell'ER e determina la traslocazione della proteina ad altri compartimenti subcellulari.

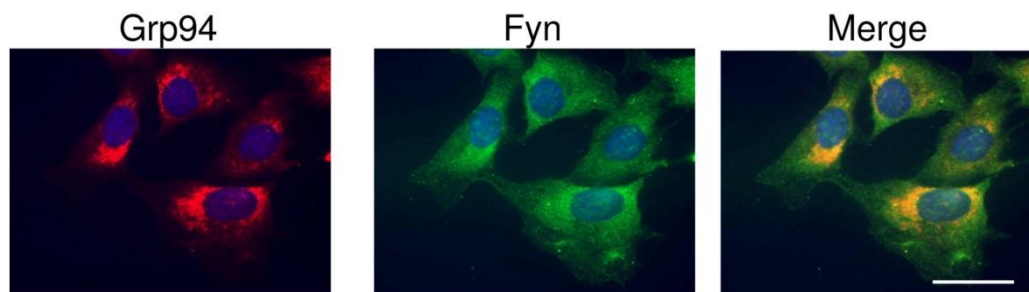


**Figura 42. Analisi dello stato di Tyr-fosforilazione di Grp94 nelle frazioni sub-cellulari di cellule C2C12 durante il differenziamento.** Le frazioni sub-cellulari 1-2, 5-7 e 9-11 ottenute mediante gradiente di Optiprep™ descritto in figura 41, sono riunite, diluite fino al 8% di Optiprep™ e centrifugate. Il precipitato è stato poi risospeso in tampone lisi ed immunoprecipitato con anticorpo anti-Grp94. Gli immunocomplessi sono stati quindi rivelati prima mediante anticorpo anti-pY ed in seguito con anti-Grp94. La figura è rappresentativa di quattro esperimenti separati.

### 3.5 IDENTIFICAZIONE DEL COMPARTIMENTO SUB-CELLULARE IN CUI Fyn E Grp94 INTERAGISCONO.

Dati bibliografici dimostrano che la localizzazione a livello della membrana plasmatica per le tirosin-chinasi della famiglia Src non è esclusiva. Infatti, alcuni membri della famiglia sono stati identificati in diversi compartimenti subcellulari quali: endosomi, vescicole sinaptiche e di secrezione, apparato del Golgi e mitocondri (9-12). Per confermare l'interazione di Fyn e Grp94 a livello del ER, abbiamo approntato esperimenti di immuno-localizzazione sub-cellulare mediante microscopia a fluorescenza ed elettronica utilizzando cellule C2C12 proliferanti. La marcatura con anticorpi fluorescenti ci ha permesso di dimostrare che mentre Grp94 (fluorescenza rossa) localizza a livello del ER in mioblasti proliferanti, Fyn

(fluorescenza verde) appare distribuito in diverse frazioni sub-cellulari, anche se una buona parte della proteina è presente a livello del ER dove co-localizza con Grp94, come dimostrato dalla sovrapposizione delle due marcature (Figura 43).

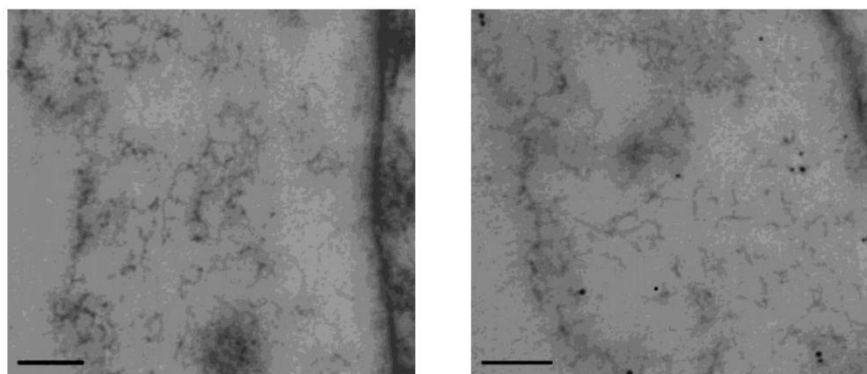


**Figura 43. Immunolocalizzazione di Grp94 e Fyn in cellule C2C12 proliferanti.** La co-localizzazione di Grp94 e Fyn è determinata in mioblasti proliferanti mediante marcatura anti-Grp94 (fluorescenza rossa) e anti-Fyn (fluorescenza verde). La sovrapposizione delle due immunomarcature definisce la co-localizzazione delle due proteine mediante colorazione gialla. Scala della barra = 0.5  $\mu$ m. La figura è rappresentativa di tre esperimenti separati.

L'analisi tramite microscopia elettronica "immunogold" in cellule C2C12 proliferanti ha messo in evidenza che spazialmente le proteine sono vicine: Grp94 (particella d'oro colloidale del diametro di 10 nm) e Fyn (particella di diametro di 15 nm) co-localizzano e sono ancorate a delle strutture reticolari di tipo vescicolare prossime alla membrana nucleare compatibili con il ER (Figura 44). In particolare, la Figura 44 mostra che Fyn e Grp94 co-localizzano nel lume di due strutture vescicolari, facendoci ipotizzare che la Tyr-fosforilazione della "chaperone" avvenga all'interno del ER.

A conferma dei dati ottenuti mediante gli esperimenti di co-localizzazione, e ricordando che Grp94 è descritta essere presente per il 90% come proteina del lume del ER e per il restante 10% come proteina integrale di membrana dello stesso (187, 188), abbiamo cercato di determinare quale delle due frazioni di Grp94 potesse essere substrato della tirosin-chinasi Fyn nel ER.

A questo scopo, le frazioni del ER di cellule C2C12 alla sesta ora di differenziamento, ottenute dopo centrifugazione su gradiente discontinuo come precedentemente descritto (vedi Figura 41), sono state trattate con proteinasi K in assenza e in presenza di Triton X-100.



**Ctrl**

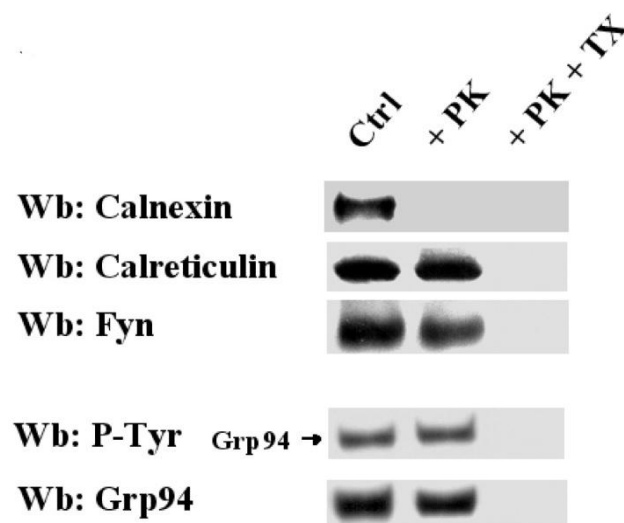
■ **Fyn**

■ **Grp94**

**Figura 44. Analisi immunogold della localizzazione sub-cellulare di Fyn e Grp94 nel ER di mioblasti proliferanti.** Cellule C2C12 proliferanti sono state incluse in cellette di agar come descritto in Materiali e Metodi. Sezioni ultrasottili sono marcate utilizzando anticorpi primari anti-Fyn e anti-Grp94, ai quali sono in seguito coniugati anticorpi secondari legati a particelle d'oro colloidale. Per Fyn le particelle d'oro hanno un diametro di 15 nm, mentre per Grp94 hanno un diametro di 10 nm. Il controllo rappresenta le sezioni incubate solo con anticorpi secondari. La scala della barra = 0.5  $\mu$ m. M.P., membrana plasmatica. La figura è rappresentativa di tre esperimenti separati.

I campioni così ottenuti sono stati in seguito analizzati mediante Western blot. In Figura 45, si può notare come l'azione della proteinasi, che digerisce le proteine localizzate dal lato citosolico delle vescicole, non altera apprezzabilmente la quantità proteica di Fyn e di Grp94, mentre degrada una piccola aliquota di Grp94. È interessante notare tuttavia, che il grado di Tyr-fosforilazione della “chaperone” non viene ridotto dal trattamento con la proteinasi (Figura 45) confermando che è la forma luminale di Grp94 ad essere substrato dell'attività chinasi di Fyn.

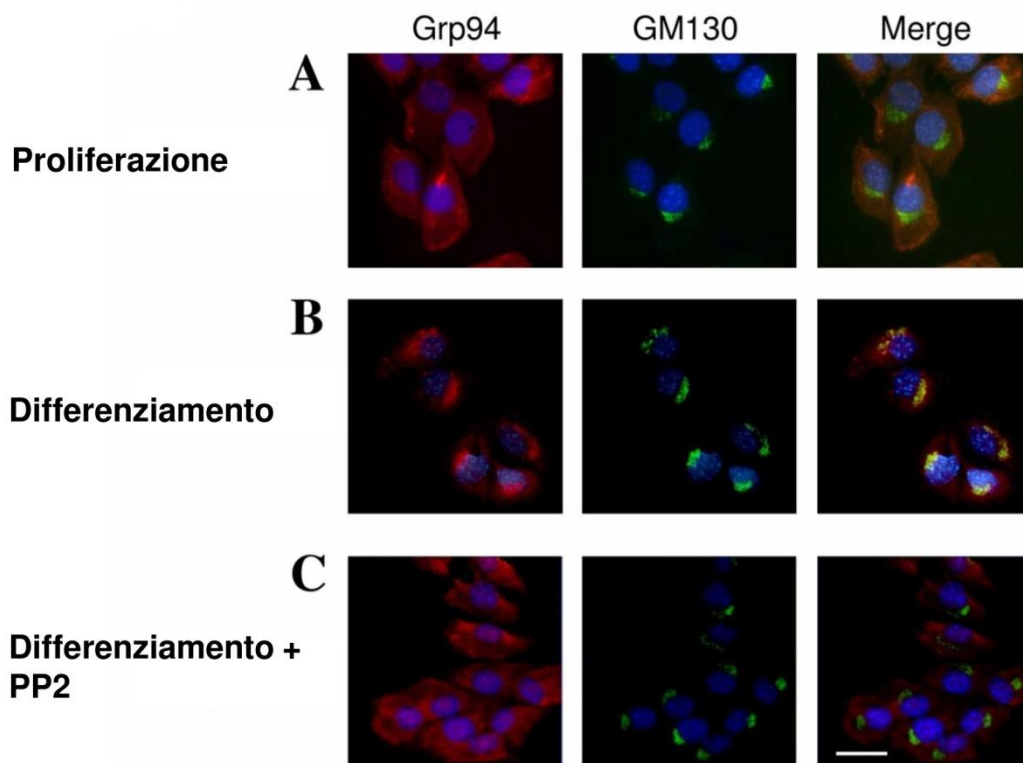
Anche per il trattamento con proteinasi K i controlli effettuati hanno verificato l'efficacia dell'analisi. Solo la calreticulina, che è una proteina del lume dell'ER, ma non la porzione citosolica della proteina transmembrana calnessina, è completamente protetta dal trattamento con la proteasi. Come atteso, in presenza di Triton X-100, l'enzima proteolitico nelle medesime condizioni sperimentali è in grado di agire sull'intera quantità delle proteine dell'ER.



**Figura 45. Fyn fosforila Grp94 nel lumen del reticolo endoplasmatico di mioblasti.** Il reticolo endoplasmatico di cellule C2C12 alla sesta ora di differenziamento viene isolato mediante gradiente di Optiprep™ come descritto in figura 41. Il campione viene suddiviso in aliquote e queste trattate senza (Ctrl) o con 50ng/ml di proteinasi K (PK), entrambi in assenza o presenza di Triton X-100 (TX) come descritto in Materiali e Metodi. Le aliquote sono in seguito saggate mediante rivelazione anticorpale con anti-calnexina, anti-calreticulina e anti-Fyn. Parallelamente frazioni delle aliquote prima citate sono rivelate con anticorpi anti-pY e anti-Grp94. La figura è rappresentativa di tre esperimenti separati.

### 3.6 VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE DI GRP94 NELL'APPARATO DEL GOLGI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE C2C12.

I risultati finora presentati evidenziano la presenza di Grp94 Tyr-fosforilata a livello della membrana plasmatica in cellule C2C12 differenzianti (Figura 42). La traslocazione dal ER alla membrana cellulare, come già visto anche nell'analisi delle frazioni subcellulari, avviene mediante il transito attraverso l'apparato del Golgi. La traslocazione della proteina è stata da noi confermata attraverso immuno-localizzazione con microscopia a fluorescenza. Abbiamo utilizzato come marker del Golgi GM130, una proteina della matrice dell'apparato. Per l'esperimento sono state utilizzate sia cellule proliferanti che differenzianti in assenza ed in presenza di PP2.



**Figura 46. Immunolocalizzazione di Grp94 e GM130 in cellule C2C12.** Cellule C2C12 proliferanti (A), differenzianti alla sesta ora (B,C) in assenza (A,B) ed in presenza di 10  $\mu$ M PP2 (C) sono state marcate con anticorpi anti-Grp94 (fluorescenza rossa) ed anti-GM130 (fluorescenza verde). Nella sovrapposizione delle due marcature la co-localizzazione delle proteine è indicata dal colore giallo (merge). I dettagli metodologici sono descritti in Materiali e Metodi. La figura è rappresentativa di tre esperimenti separati.

Come è possibile osservare in Figura 46, mentre in cellule C2C12 proliferanti (A), la localizzazione della “chaperone” (fluorescenza rossa) non presenta alcuna sovrapposizione con quella di GM130 (fluorescenza verde), in cellule C2C12 differenzianti la marcatura con l’anticorpo anti-Grp94 appare nell’apparato del Golgi, come dimostrato dalla sovrapposizione delle due marcature (Figura 46B). Inoltre, dopo esposizione delle cellule C2C12 all’inibitore PP2, la distribuzione di Grp94 appare identica a quella osservata in condizioni proliferanti (Figura 46C), indicando che l’inibizione della Tyr-fosforilazione annulla la redistribuzione della proteina nell’apparato del Golgi.

### **3.7 RUOLO DELLA Tyr-FOSFORILAZIONE DI Grp94 NELLA FORMAZIONE DI UN COMPLESSO MOLECOLARE SPECIFICO DELLO STATO DI DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE.**

Poichè è noto da tempo che le “chaperone” si trovano nel ER sotto forma di complessi proteici (188), ed avendo dimostrato che la fosforilazione è una modifica post-traduzionale che permette a Grp94 di lasciare il ER, abbiamo ipotizzato che la Tyr-fosforilazione della proteina potesse in qualche modo modulare la sua capacità di interazione con altri partners. Si sono quindi sottoposti a centrifugazione su gradiente di glicerolo estratti delle frazioni del ER di cellule C2C12 proliferanti e differenzianti, allo scopo di separare i complessi multi proteici presenti in questa frazione sub-cellulare.

Il profilo di distribuzione di Grp94 varia nelle diverse condizioni sperimentali: in C2C12 proliferanti la “chaperone” è inclusa in complessi proteici con un peso molecolare (PM) compreso tra 150 e 400 kDa (Figura 47A, pannello a sinistra), in condizioni differenzianti, invece, la proteina si presenta in complessi con PM compreso tra 150 e 500 kDa (Figura 47B, pannello a sinistra). L’analisi dello stato di Tyr-fosforilazione mediante Western blot degli immunoprecipitati di Grp94 ottenuti dalle frazioni corrispondenti ai diversi complessi ha dimostrato che in cellule proliferanti la proteina inclusa in complessi a basso peso molecolare (frazioni 5-7 del gradiente) non è Tyr-fosforilata (Figura 47A, pannello a destra).

Diversamente, l’analisi degli immunoprecipitati ottenuti in condizioni differenzianti ha messo in luce che il grado di Tyr-fosforilazione di Grp94 è molto maggiore nel complesso di 500 kDa (frazioni 10-11 del gradiente) rispetto a quello rilevato per i complessi a peso molecolare inferiore (frazioni 5-7 del gradiente) (Figura 47B, pannello destro).

Questi dati suggeriscono che sia l'evento di Tyr-fosforilazione indotto dal processo di differenziamento dei mioblasti, a determinare l'inclusione di Grp94 in un complesso ad elevato peso molecolare. Tale ipotesi è supportata dal fatto che, in cellule C2C12 differenzianti in presenza dell'inibitore PP2, l'inibizione della Tyr-fosforilazione di Grp94 è condizione sufficiente per impedire l'inclusione della proteina nel complesso di 500 kDa (Figura 47C, pannello a sinistra).

#### Reticolo Endoplasmatico



#### Apparato del Golgi



**Figura 47. Grp94 Tyr-fosforilata è inclusa in complessi proteici ad alto peso molecolare nel ER di cellule C2C12 differenzianti.** Cellule C2C12 proliferanti (A), differenzianti alla sesta ora (B,C,D,E) sono mantenute in coltura in assenza (A,B,D,E) e in presenza di 10  $\mu$ M PP2 (C) sono state sonicate e la frazione particolata post-nucleare centrifugata su gradiente discontinuo di OptiPrep™ come descritto in figura 41. Le frazioni corrispondenti al ER (A,B,C) e dell'apparato del Golgi (D), quest'ultime trattate in assenza e presenza di  $\lambda$ PPase, sono state lisate e l'estratto ottenuto è stato sottoposto ad ultracentrifugazione su gradiente discontinuo di glicerolo come descritto in Materiali e Metodi. Le frazioni sono state raccolte dalla cima del gradiente ed analizzate mediante Western blot con l'anticorpo anti-Grp94. (Pannello a destra) Le frazioni del gradiente 5-7 e 10-11 ottenute in (A,B,C) e le frazioni del gradiente 4-8 e 10-11 ottenute in (D,E) sono state riunite ed immunoprecipitate con l'anticorpo anti-Grp94. Gli immunocomplessi ottenuti sono stati quindi analizzati mediante Western blot con anticorpo anti-pY e, dopo *stripping* delle membrane, con anticorpo anti-Grp94.

Avendo dimostrato che solo dopo fosforilazione tirosinica Grp94 lascia il ER, abbiamo voluto analizzare se il complesso a 500 kDa fosse implicato nella sub-localizzazione cellulare della proteina. Si è sottoposto a gradiente di glicerolo l'estratto della frazione dell'apparato di Golgi, isolato tramite centrifugazione differenziale su gradiente discontinuo di Optiprep™. L'analisi della distribuzione di Grp94 dimostra che la proteina trasloca inclusa nel complesso ad alto PM (Figura

47D, pannello a sinistra) ed in stato Tyr-fosforilato (Figura 47D, pannello a destra). Definitiva conferma del fatto che la Tyr-fosforilazione è un prerequisito alla formazione del complesso di 500 kDa e per la traslocazione di Grp94, è stata data dal pre-trattamento con fosfatasi delle frazioni corrispondenti all'apparato di Golgi successivamente sottoposte a gradienti di glicerolo. Nelle condizioni indotte dalla de-fosforilazione di Grp94 (Figura 47E, pannello a destra), la proteina compare inclusa in complessi proteici a basso PM (Figura 47E, pannello a sinistra).

#### 4. DISCUSSIONE.

Grp94 (Glucose-regulated protein 94 kDa) è una proteina “chaperone” residente nel lume dell’ER, la cui espressione aumenta in risposta a condizioni di stress cellulare, tra cui la mancanza di glucosio. Questa proteina è anche coinvolta nel sistema dell’omeostasi degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e, grazie alla sua capacità di legare peptidi, riveste un ruolo importante nel processo di presentazione dell’antigene capace di evocare una risposta immunitaria T citotossica (189, 190).

Pur presentando all’estremità C-terminale la sequenza KDEL di ritenzione nel lume dell’ER, Grp94 può assumere diverse localizzazioni subcellulari. In particolare, in cellule C2C12 differenzianti è stata messa in evidenza la localizzazione di Grp94 a livello della membrana plasmatica, dove riveste un ruolo importante nel processo di formazione dei miotubi (60).

I risultati ottenuti in questa tesi dimostrano che la Src-chinasi Fyn si attiva e fosforila Grp94 durante le prime fasi del processo differenziativo. La Tyr-fosforilazione della “chaperone” è associata alla traslocazione della proteina dal ER alla membrana plasmatica. Abbiamo determinato che mentre in cellule C2C12 proliferanti Fyn è inibito ed in conformazione chiusa, il processo di differenziamento induce l’attivazione della chinasi con conseguente interazione e fosforilazione di Grp94 già nelle fasi precoci dello sviluppo muscolare, prima cioè che vi sia l’espressione di geni muscolo specifici e la conseguente fusione dei mioblasti in cellule multinucleate. Inoltre il massimo grado di Tyr-fosforilazione detectato coincide con il massimo stato di attivazione della chinasi.

Mediante esperimenti di immuno-localizzazione sia al microscopio a fluorescenza sia al microscopio elettronico, abbiamo dimostrato che Fyn e Grp94 localizzano a livello del ER. In particolare abbiamo determinato che è la frazione solubile e luminare di Grp94 ad essere fosforilata da Fyn nel lumen del ER.

Le tirosin-chinasi della famiglia Src sono normalmente ancorate al lato citosolico delle membrane cellulari. Tuttavia evidenze bibliografiche recenti mostrano la localizzazione di altri membri della famiglia in diversi compartimenti subcellulari, tra cui la membrana interna dei mitocondri (12). Fyn è la prima chinasi Src evidenziata nel lume del ER. Dati sperimentali hanno dimostrato che Fyn apparentemente non presenta una sequenza post-traslazionale di traslocazione al ER. La presenza della chinasi in questo compartimento sub-cellulare, potrebbe essere me-

diata da una specifica proteina di ancoraggio secondo il modello per cui c-Src trasloca nei mitocondri grazie all'interazione con l'adattatore Dok-4 (191, 192).

I nostri esperimenti hanno inoltre dimostrato che la Tyr-fosforilazione è un prerequisito per la traslocazione della proteina dal ER al Golgi ed alla membrana plasmatica durante le prime fasi del differenziamento muscolare. Infatti, in cellule differenzianti in presenza di PP2, inibitore specifico per l'attività SFK, si ha una mancata Tyr-fosforilazione della chaperone che rimane localizzata a livello del ER.

È stato da noi studiato anche il meccanismo di traslocazione di Grp94 ed è stato evidenziato che l'evento di Tyr-fosforilazione riveste un ruolo importante nel mediare l'uscita di Grp94 dal ER modulando la sua capacità di interazione con altre molecole presenti in questo comparto subcellulare. Infatti, il processo di differenziamento in cellule C2C12 induce l'inclusione di Grp94 Tyr-fosforilata in un complesso multi-proteico ad elevato peso molecolare (circa 500 kDa), l'unico competente a veicolare la proteina dal ER all'apparato del Golgi. L'inibizione della Tyr-fosforilazione di Grp94, ottenuta trattando con PP2 mioblasti differenzianti, è condizione sufficiente per impedire l'inclusione della proteina nel complesso ad alto peso molecolare e bloccarne il rilascio dal ER. A successiva conferma, i dati sperimentali che derivano dal trattamento con  $\lambda$ PPase del complesso multi-proteico di 500 kDa già migrato all'apparato del Golgi, mostrano come la defosforilazione di Grp94 correli con la mancata formazione del complesso ad alto peso molecolare e la redistribuzione della proteina in complessi di massa molecolare inferiore.

Benché le proteine "chaperone" siano normalmente considerate proteine residenti nel ER, recenti dati bibliografici riportano un loro ruolo emergente quando espresse sulla superficie della membrana plasmatica. Oltre a Grp94 ritroviamo anche Grp74, Grp78, Hsp72, Hsp70, Hsp60, Hsp54, Hsp27, calnexina, calreticulina e PDI (Protein Disulfide Isomerase) (193-198). Queste sono state individuate sulla superficie di varie linee cellulari che includono cellule tumorali, fibroblasti, mioblasti e cellule del sangue, sistemi in cui sono ad esempio coinvolte nella presentazione dell'antigene, nel differenziamento muscolare.

La quasi totalità di queste proteine, come Grp94, presentano al C-terminale un motivo di ritenzione al ER, KDEL. La migrazione verso altri compartimenti della

cellula suggerisce un'anomalia del meccanismo di ritenzione al ER: la causa è da ricercare in una diminuzione del numero di recettori che riconoscono il KDEL o ad una loro mancata funzionalità. Al sopraggiungere di queste complicazioni, potrebbero definirsi dei meccanismi alternativi di interazione proteina-proteina o modifiche post-traduzionali per cui le "chaperone" sarebbero in grado di lasciare il ER.

Per alcune di queste è stata dimostrata una correlazione tra l'evento Tyr-fosforilativo e la loro redistribuzione cellulare. Ad esempio, la fosforilazione di Hsp70 è determinante per la traslocazione nucleare della proteina e per la resistenza allo shock nei miociti cardiaci (185). È stato recentemente pubblicato che la Tyr-fosforilazione di Grp94 media la sua localizzazione al livello della superficie cellulare degli spermatozoi (184). È stato ipotizzato che la presenza dei gruppi fosfato a livello dei residui tirosinici possa mascherare la sequenza di ritenzione al ER all'interazione con il recettore favorendo il rilascio della "chaperone".

La Tyr-fosforilazione di Grp94 nelle prime fasi del differenziamento muscolare è fondamentale per la traslocazione della "chaperone" alla membrana plasmatica dove media il processo di fusione dei mioblasti.



# ***Bibliografia***



## BIBLIOGRAFIA.

1. Manning, G., White, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. **298**: 1912-1934.
2. Cowan-Jacob, S.W. 2005. Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2608-2626.
3. Rous. P.A. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumour cells. *J. Exp. Med.* **13**: 397-411.
4. Brugge, J.S., Erikson, R.L. 1977. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*. **269**: 346-348.
5. Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. **260**: 170-173.
6. Brown, M., Cooper, J.A. 1996. Regulation, substrates and function of Src. *Biochim. Biophys. Acta*. **1287**: 121-149.
7. Boggon, T.J., Eck, M.J. 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. **23**: 7918-7927.
8. Roskoski, R.J. 2004. Src protein tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **324**: 1155-1164.
9. Kaplan, K.B., Bibbins, K.B., Swedlow, J.R., Arnaud, M., Morgan, D.O., Varmus, H.E. 1994. Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and its regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *EMBO J.* **13**: 4745-4756.
10. Mohn, H., LeCabec, V., Fischer, S., Maridonneau-Parini, I. 1995. The Src family protein-tyrosine kinase p59<sup>hck</sup> is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosomes during cell activation. *Biochem. J.* **309**: 657-665.
11. Matsuda, D., Nakayama, Y., Horimoto, S., Kuga, T., Ikeda, K., Kasahara, K., Yamaguchi, N. 2006. Involvement of Golgi-associated Lyn tyrosine kinase in the translocation of annexin II to the endoplasmic reticulum under oxidative stress. *Exp. Cell Res.* **312**: 1205-1217.

12. Salvi, M., Brunati, A.M., Bordin, L., La Rocca, N., Clari, G. Toninello, A. 2002. Characterization and location of Src-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1589**: 181-195.
13. David-Pfeuty, T., Nouvian-Dooghe, Y. 1990. Immunolocalization of the cellular Src protein in interphase and mitotic NIH c-Src overexpresser cells. *J. Cell Biol.* **111**: 3097-3116.
14. Sigal, C.T., Zhou, W., Buser, C.A., McLaughlin, S., Resh. M.D. 1994. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 12253-12257.
15. Chong, Y.P., Mulhern, T.D., Cheng, H.C. 2005. C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK) – endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors.* **23**: 233-244.
16. Kmiecik, T.E., Shalloway, D., 1987. Activation and suppression of pp60<sup>c-src</sup> transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* **49**: 65-73.
17. Xu, W., Harrison, S.C., Eck, M.J. 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature.* **385**: 595-602.
18. Sicheri, F., Moarefi, I., Kuriyan, J. 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature.* **385**: 602-9.
19. Roskoski, R. 2005. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **331**: 1-14.
20. Bjorge, J.D., Pang, A., Fujita, D.J. 2000. Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* **275**: 41439-41446.
21. Huntington, N.D., Tarlinton, D.M., 2004. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol. Lett.* **94**: 167-174.
22. Wang, D., Esselman, W.J., and Cole, P.A. 2002. Substrate conformational restriction and CD45-catalyzed dephosphorylation of tail tyrosine-phosphorylated Src protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 40428-33.

23. Poole, A.W., and Jones, M.L. 2005. A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell. Signal.* **17**: 1323-32.
24. Somani, A.K., Bignon, J.S., Mills, G.B., Siminovitch, K.A., Branch, D.R. 1997. Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**: 21113-21119.
25. Zhang, S.Q., Yang, E., Kontaridis, M.I., Bivona, T.G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J.A., Schraven, B.L., Philips, M.R., Neel, B.G. Shp2 regulates Src family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol. Cell.* **13**: 341-355.
26. Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J., Miller, W.T. 1997. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* **385**: 650-3.
27. Briggs, S.D., Sharkey, M., Stevenson, M., Smithgall, T.E. 1997. SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* **272**: 17899-17902.
28. Lerner, E.C., Smithgall, T.E. 2002. SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 365-369.
29. Porter, M., Schindler, T., Kuriyan, J., Miller, W.T. 2000. Reciprocal regulation of Hck activity by phosphorylation of Tyr(527) and Tyr(416). Effect of introducing a high affinity intramolecular SH2 ligand. *J. Biol. Chem.* **275**: 2721-2726.
30. Lerner, E.C., Tribble, R.P., Schiavone, A.P., Hochrein, J.M., Engen, J.R., Smithgall, T.E. 2005. Activation of the Src family kinase Hck without SH3-linker release. *J. Biol. Chem.* **280**: 40832-40837.
31. Gonfloni, S., Williams, J.C., Hattula, K., Weijland, A., Wierenga, R.K., Superti-Furga, G. 1997. The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src. *EMBO J.* **16**: 7261-7271.
32. Young, M.A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., Kuriyan, J. 2001. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck

- underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell*. **105**: 115-126.
33. Caplan, A.J., Mandal, A.K., Theodoraki, M.A. 2007. Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol.* **17**: 87-92.
  34. Citri, A., Harari, D., Shohat, G., Ramakrishnan, P., Gan, J., Lavi, S., Eisenstein, M., Kimchi, A., Wallach, D., Pietrokovski, S., Yarden, Y. 2006. Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.* **281**: 14361-14369.
  35. Xu, Y., Lindquist, S. 1993. Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60<sup>v-src</sup> kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7074-7078.
  36. Scholz, G.M., Hartson, S.D., Cartledge, K., Volk, L., Matts, R.L., Dunn, A.R. 2001. The molecular chaperone Hsp90 is required for signal transduction by wild-type Hck and maintenance of its constitutively active counterpart. *Cell. Growth Differ.* **12**:409-17.
  37. Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M.F., Fritz, L.C., Burrows, F.J. 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. **425**: 407-410.
  38. Chong, Y.P., Ia, K.K., Mulhern, T.D., and Cheng, H.C. 2005. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim. Bioph. Acta* **1754**: 210-20.
  39. Mustelin, T., Tasken, K., 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem. J.* **371**: 15-27.
  40. Baker, M., Gamble, J., Tooze, R., Higgins, D., Yang, F.T., O'Brien, P.C., Coleman, N., Pingel, S., Turner, M., Alexander, D.R. 2000. Development of T-leukaemias in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mutant Lck mice. *EMBO J.* **19**: 4644-4654.
  41. Chiang, G.G., Sefton, B.M., 2001. Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **19**: 23173-23178.
  42. Chown, L.M., Jarvis, C., Hu, Q., Nye, S.H., Gervais, F.G., Veillette, A., Matis, L.A. 1994. Ntk: A Csk-related protein-tyrosine kinase expressed in brain and T-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 4975-4979.

43. Klages, S., Adam, D., Class, K., Fargnoli, J., Bolen, J.B., Penhallow, R.C. 1994. Ctk: A protein-tyrosine kinase related to Csk that defines an enzyme family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 2597-2601.
44. Chong, Y.P., Mulhern, T.D., Zhu, H.J., Fujita, D.J., Biorge, J.D., Tantonco, J.P., Sotirellis, N., Lio, D.S., Scholz, G. 2004. A novel non-catalytic mechanism employed by the C-terminal Src-homologous kinase to inhibit Src-family kinase activity. *J. Biol. Chem.* **279**: 20752-20766.
45. Chong, Y.P., Chan, A.S., Chan, K.C., Williamson, N.A., Lerner, E.C., Smithgall, T.E., Biorge, J.D., Fujita, D.J., Purcell, A.W., Scholz, G., Mulhern, T.D., Cheng, H.C. 2006. C-terminal Src kinase-homologous kinase (CHK), a unique inhibitor inactivating multiple active conformations of Src family tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **281**: 32988-32999.
46. Ingley, E. 2008. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* **1784**: 56-65.
47. Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollock, B.A., Connelly, P.A. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck and Fyn T-dependent cell activation. *J. Biol. Chem.* **271**: 695-701.
48. Geahlen, R.L., Handley, M.D., Harrison, M.L. 2004. Molecular interdiction of Src-family kinase signaling in hematopoietic cells. *Oncogene.* **23**: 8024-8032.
49. Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Uber-sax, J., Blethrow, J., Morgan, D.O., Shokat, K.M. 1999. *Chem. Biol.* **6**: 671-678.
50. Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kuriyan, J. 1999. Crystal structure of Hck in complex with a Src family selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol. Cell.* **3**: 639-648.
51. Zhu, X., Kim, J.L., Newcomb, J.R., Rose, P.E., Stover, D.R., Toledo, L.M., Zhao, H., Morgenstern, K.A. 1999. Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. *Struct. Fold. Des.* **7**: 651-661.

52. Blake, R.A., Broome, M.A., Liu, X., Wu, J., Gishizky, M., Sun, L., Courtneidge, S.A. 2000. SU6656, a selective Src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 9018-9027.
53. Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P. 2003. *Biochem. J.* **371**: 199-204.
54. Machida, K., Mayer, B.J. 2005. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim. Biophys. Acta.* **1747**: 1-25.
55. Lawrence, D. S. 2005. Signaling protein inhibitors via the combinatorial modification of peptide scaffolds. *Biochim. Biophys. Acta.* **1754**: 50-57.
56. Kwiatkowska, K., Frey, J., Sobota, A. 2003. Phosphorylation of Fc gammaRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J. Cell Sci.* **116**: 537-550.
57. Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., Resh, M.D. 2000. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization and T-cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **270**: 261-270.
58. Liang, X., Lu, Y., Wilkes, M., Neubert, T.A., Resh, M.D. 2004. The N-terminal SH4 region of the Src family kinase Fyn is modified by methylation and heterogeneous fatty acylation: role in membrane targeting, cell adhesion and spreading. *J. Biol. Chem.* **279**: 8133-8139.
59. Ruzzene, M., Brunati, A.M., Sarno, S., Marin, O., Donella-Deana, A., Pinna, L.A. 2000. Ser/Thr phosphorylation of hematopoietic specific protein 1 (HS1): implication of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.* **267**: 3065-3072.
60. Gorza, L., Vitadello, M. 2000. Reduced amount of the glucose-regulated protein GRP94 in skeletal myoblasts results in loss of fusion competence. *FASEB J.* **14**: 461-475.
61. Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S. 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**: 219-234.

62. Tibaldi, E., Arrigoni, G., Brunati, A.M., James, P., Pinna, L.A. 2006. Analysis of a sub-proteome which co-purifies with and is phosphorylated by the Golgi casein kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 378-389.
63. Weng, Z., Thomas, S.M., Rickles, R.J., Taylor, J.A., Brauer, A.W., Seidel-Dugan, C., Michael, W.M., Dreyfuss, G., Brugge, J.S. 1994. Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4509-4521.
64. Brunati, A.M., Bordin, L., Clari, G., James, P., Quadroni, M., Baritono, E., Pinna, L.A., Donella-Deana, A. 2000. Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary and secondary phosphorylation sites. *Blood* **96**: 1550-1557.
65. Miyzaki, T., Neff, L., Tananka, S., Horne, W.C., Baron, R. 2003. Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J. Cell. Biol.* **160**: 709-718.
66. Caligaris-Cappio, F., and Hamblin, T.J. 1999. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J. Clin. Oncol.* **17**: 399-408.
67. Cheson B.D., Bennett J.M., Grever M. 1996. National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for CLL: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* **87**: 4990-4997.
68. Chiorazzi, N., Rai, R., Ferrarini, M. 2005. Chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl. J. Med.* **8**: 804-815.
69. Guipaud, O., Deriano, L., Salin, H., Vallat, L., Sabatier, L., Merle-Béral, H., Delic, J. 2003. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet.* **4**: 506-14.
70. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M., Chiorazzi, N. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**: 1840-7.
71. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. and Stevenson, F.K. 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **15**:1848-1854.

72. Hamblin, T.J. 2007. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **20**: 455-468.
73. Qian, D., Weiss A.T. 1997. T cell receptor signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 205-212.
74. Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S., Wright, G., Davis, R.E., Henrikson, S.E., Zhao, H., Ibbotson, R.E., Orchard, J.A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Arthur, D.C., Marti, G.E., Wilson, W.H., Hamblin, T.J., Oscier, D.G., Staudt, L.M. 2003. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* **101**: 4944-51.
75. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., Montserrat, E. 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* **348**: 1764-75.
76. Dameshek, W. 1967. Chronic lymphocytic leukemia – an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* **29**: 566-584.
77. Chiorazzi, N. 2007. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **20**: 399-413.
78. Damle, R.N., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Fais, F., Yan, X.J., Sison, C.P., Allen, S.L., Kolitz, J., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Budde, P., Frey, J., Rai, K.R., Ferrarini, M., Chiorazzi, N. 2002. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* **99**: 4087-4093.
79. Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J.C., Grever, M.R., Cheson, B.D., Chiorazzi, N., Wilson, W.H., Kipps, T.J., Brown, P.O., Staudt, L.M. 2001. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **194**: 1639-1647.

80. Schmid, C., Isaacson, P.G. 1994. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology*. **24**: 455-451.
81. Caligaris-Cappio, F. 2003. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* **123**: 380-388.
82. Pierce, S.K. 2002. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 96-105.
83. Wang, L.D, Clark, M.R. 2003. B-cell antigen-receptor signaling in lymphocyte development. *Immunology*. **110**: 411-420.
84. Kipps, T.J. 2007. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **20**: 415-424.
85. Semichon, M., Merle-Béral, H., Lang, V., Bismuth, G. 1997. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL. *Leukemia*. **100**: 1921-1928.
86. Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Sica, S., Leone, G., Efremov, D.G. 2007. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. **109**: 2032-2039.
87. Contri, A., Brunati, A.M., Trentin, L., Cabrelle, A., Miorin, M., Cesaro, L., Pinna, L.A., Zambello, R., Semenzato, G., Donella-Deana, A. 2005. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J. Clin. Invest.* **115**: 369-378.
88. Hunter, S., Burton, E.A., Wu, S.C., Anderson, S.M. 1999. Fyn associates with Cbl and phosphorylates tyrosine 731 in Cbl, a binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**: 2097-106.
89. Takemoto, Y., Sato, M., Furuta, M., Hashimoto, Y. 1996. Distinct binding patterns of HS1 to the Src SH2 and SH3 domains reflect possible mechanisms of recruitment and activation of downstream molecules. *Int. Immunol.* **8**: 1699-1705.
90. Jiang, T., Qiu, Y. 2003. Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J. Biol. Chem.* **278**:15789-15793.

91. Jin, Y.J., Yu, C.L., Burakoff, S.J. 1999. Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 28301-28307.
92. Schreiner, S.J., Schiavone, A.P., Smithgall, T.E. 2002. Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain. *J. Biol. Chem.* **277**: 45680-45687.
93. Ruzzene, M., Brunati, A.M., Sarno, S., Donella-Deana, A., and Pinna, L.A. 1999. Hematopoietic lineage cell specific protein 1 associates with and down-regulates protein kinase CK2. *FEBS Lett.* **461**: 32-6.
94. Brunati, A.M., Deana, R., Folda, A., Massimino, M. L., Marin, O., Ledro, S., Pinna, L.A., Donella-Deana, A. 2005. Thrombin-induced tyrosine phosphorylation of HS1 in human platelets is sequentially catalyzed by Syk and Lyn tyrosine kinases and associated with the cellular migration of the protein. *J. Biol. Chem.* **280**: 21029-21035.
95. Hao, J.J., Carey, G.B., Zhan, X. 2004. Syk-mediated Tyrosine Phosphorylation Is Required for the Association of Hematopoietic Lineage Cell-specific Protein 1 with Lipid Rafts and B Cell Antigen Receptor Signalingosome Complex. *J Biol Chem.* **279**: 33413-33420
96. Yamanashi, Y., Fukuda, T., Nishizumi, H., Inazu, T., Higashi, K., Kitamura, D., Ishida, T., Yamamura, H., Watanabe, T., Yamamoto, T. 1997. Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **185**: 1387-92.
97. Scielzo, C., Ghia, P., Conti, A., Bachi, A., Guida, G., Geuna, M., Alessio, M., Caligaris-Cappio, F. 2005. HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J. Clin. Invest.* **115**: 1644-1650.
98. Kamal, A., Boehm, M.F., Burrows, F.J. 2004. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol. Med.* **10**: 283-290.
99. Fenteany, G., Schreiber, S.L. 1998. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* **273**: 8545-8548.
100. Jones, D.T., Addison, E., North, J.M., Lowdell, M.W., Hoffbrand, A.V., Mehta, A.B., Ganeshaguru, K., Folarin, N.I., Wickremasinghe, R.G. 2004. Geldanamycin and herbimycin A induce apoptotic killing of B chronic

- lymphocytic leukemia cells and augment the cells' sensitivity to cytotoxic drugs. *Blood*. **103**: 1855-1861.
101. Giannini, A., Bijlmarkers, M.J. 2004. Regulation of the Src family kinase Lck by Hsp90 and ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 5667-5676.
  102. Koga, F., Xu, W., Karpova, T.S., McNally, J.G., Baron, R., Neckers, L. 2006. Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 11318-11322.
  103. Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M.F., Fritz, L.C., Burrows, F.J. 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. **425**: 407-410.
  104. Castro, J.E., Prada, C.E., Loria, O., Kamal, A., Chen, L., Burrows, F.J., Kipps, T.J. 2005. ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **106**: 2506-2512.
  105. Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., Vainchenker, W. 2006. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2939-2953.
  106. Levine, R.L., Pardanani, A., Tefferi, A., Gilliland, D.G. 2007. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature* **7**: 673-683.
  107. Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D. 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**: 2292-2302.
  108. Spivak, J.L. 2004. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin. Hematol.* **41**: 1-5.
  109. Adamson, J.W., Fialkow, P.J., Murphy, S., Prchal, J.F., Steinmann, L. 1976. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N. Engl. J. Med.* **295**: 913-916.
  110. Ferraris, A.M., Mangerini, R., Racchi, O., Rapezzi, D., Rolfo, M., Casiaro, S. et al. 1999. Heterogeneity of clonal development in chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Hematol.* **60**: 158-160.

111. El Kasser, N., Hetet, G., Briere, J., Grandchamp, B. 1997. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocytemia: Advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* **89**: 128-134.
112. Nowell, P.C., Hungerford, D.A. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **25**: 85-109.
113. Bartram, C.R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kester, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M.A., Davies, T., Stone, M. et al 1983. Translocation of c-Abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* **306**: 277-280.
114. Prchal, J.F., Axelrad, A.A. 1974. Letter: bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**: 1382
115. Mittelman, M., Gardyn, J., Carmel, M., Malovani, H., Barak, Y., Nir, U. 1996. Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* **20**: 459-466.
116. Dai, C.H., Krantz, S.B., Dessypris, E.N., Means, R.T. Jr, Horn, S.T., Gilbert, H.S. 1992. Polycythemia vera, II: hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **80**: 891-899.
117. Correa, P.N., Eskinazi, D., Axelrad, A.A., 1994. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood* **83**: 99-112.
118. Ihle, J.N., 1995. Cytokine receptor signaling. *Nature* **377**: 591-594.
119. Rane, S.G., Premkumar Reddy, E. 2002. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* **21**: 3334-3358.
120. Lucet, I.S., Fantino, E., Styles, M., Bamert, R., Patel, O., Broughton, S.E., Walter, M., Burns, C.J., Treutlein, H., Wilks, A.F., Rossjohn, J. 2006. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* **107**: 176-183.

121. Berchtold, S., Moriggl, R., Gouilleux, F., Silvennoinen, O., Beisenherz, C., Pfizner, E., Wissler, M., Stocklin, E., Groner B. 1997. Cytokine receptor-independent, constitutively active variants of STAT5. *J. Biol. Chem.* **272**: 30237-30243.
122. Saharinen, P., Vihinen, M., Silvennoinen, O. 2003. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 1448-1459.
123. Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W.P., Lee, S., Roberts, T.M., D'Andrea, A.D., Dearolf, C.R. 1997. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates *Drosophila* and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 1562-1571.
124. Argetsinger, L.S., Kouadio, J.L., Steen, H., Stensballe, A., Jensen, O.N., Carter-Su, C. 2004. Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. *Mol Cell. Biol.* **24**: 4955-4967.
125. Wormald, S., Hilton, D.J. 2004. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J. Biol. Chem.* **279**: 821-824.
126. Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G.R., Pellegrini, S. 1992. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* **70**: 313-322.
127. Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frohling, S., Dohner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J., Gilliland, D.G. 2005. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**: 387-397.
128. James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W. 2005. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**: 1144-1148.

129. Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., Scott M.A., Erber, W.N., Green, A.R. 2005. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**: 1054-1061.
130. Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., Skoda, R.C. 2005. A gain of function mutation of Jak2 in patients with myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**: 1779-1790.
131. Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B., Zhao, Z.J. 2005. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J. Biol. Chem.* **280**: 22788-22792.
132. Jamieson, C.H., Gotlib, J., Durocher, J.A., Chao, M.P., Mariappan, M.R., Lay, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Lilleberg, S.L., Weissman, I.L. 2006. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 6224-6229.
133. Huntly, B.J., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B.H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I.R., Akashi, K., Gilliland, D.G. 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* **6**: 587-596.
134. Kralovics, R., Guan, Y., Prchal, J.T. 2002. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* **30**: 229-236.
135. Scott, L.M., Scott, M.A., Campbell, P.J., Green, A.R. 2006. Progenitors homozygous for the V617F JAK2 mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* **108**: 2435-2437.
136. Levine, R.L., Loriaux, M., Huntly, B.J., Loh, M.L., Beran, M., Stoffregen, E., Berger, R., Clark, J.J., Willis, S.G., Nguyen, K.T., Flores, N.J., Estey, E., Gattermann, N., Armstrong, S., Look, A.T., Griffin, J.D., Bernard, O.A., Heinrich, M.C., Gilliland, D.G., Druker, B., Deininger, M.W. 2005. The JAK2V617F activating mutation occur in chronic myelomonocytic

- leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **106**: 3377-3379.
137. Lu, X., Levine, R., Tong, W., Wernig, G., Pikman, Y., Zarnegar, S., Gilliland, D.G., Lodish, H. 2005. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 18962-18967.
  138. Levine, R.L., Belisle, C., Wadleigh, M., Zahrieh, D., Lee, S., Chagnon, P., Gilliland, D.G., Busque, L. 2006. X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* **107**: 4039-4041.
  139. Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Warren, A.J., Gilliland, D.G., Lodish, H.F., Green, A.R. 2007. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **356**: 459-468.
  140. Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., DeAngelo, D.J., Clark, J.J., Lee, S.J., Golub, T.R., Wadleigh, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L. 2006. MPLW515L is a novel activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Plos Med.* **3**: 270.
  141. Ding, J., Komatsu, H., Wakita, A., Kato-Uranishi, M., Ito, M., Satoh, A., Tsuboi, K., Nitta, M., Miyazaki, H., Iida, S., Ueda, R. 2004. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* **103**: 4198-4200.
  142. Lages, B., Weiss, H.J., 1999. Secreted dense granule adenine nucleotides promote calcium influx and the maintenance of elevated cytosolic calcium levels in stimulated human platelets. *Thromb. Haemost.* **81**: 286-292.
  143. Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A. 2004. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* **25**: 489-495.

144. Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Shpacovitch, V., Rattenholl, A., Moormann, C., Vergnolle, N., Luger, T.A., Hollenberg, M.D. 2005. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. *Endocr. Rev.* **26**: 1–43.
145. Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich, A. 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**: 557-560.
146. Kessler, C.M. 2004. Propensity for hemorrhage and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders. *Sem. Hematol.* **41**: 10-14.
147. Harrison, C.N. 2005. Platelets and Thrombosis in Myeloproliferative Diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 409-415.
148. Michielis, J.J., Berneman, Z., Schroyens, W., Finazzi, G., Buddle, U., van Vliet, H. 2006. The paradox of platelets activation and impaired function: platelets –von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocytemia and polycythemia vera. *Semin. Thromb. Hemost.* **32**: 589-604.
149. Kaywin, P., McDonough, M., Insel, P.A., Shattil, S.J. 1978. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors. *N. Engl. J. Med.* **299**: 505-509.
150. Ushikubi, F., Ishibashi, T., Narumiya, S., Okuma, M. 1992. Analysis of the defective signal transduction mechanism through the platelet thromboxane A2 receptor in a patient with polycythemia vera. *Thromb. Haemost.* **67**: 144-146.
151. Moliterno, A.R., Hankins, W.D., Spivak, J.L. 1998. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **338**: 572-580.
152. Buday, L., Downward, J. 2007. Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim. Bioph. Acta* **1775**: 263–273.
153. Xu, M.J., Sui, X., Zhao, R., Dai, C., Krantz, S.B., Zhao, Z.J. 2003. PTP-MEG2 is activated in polycythemia vera erythroid progenitor cells and is required for growth and expansion of erythroid cells. *Blood* **102**: 4354-4360.

154. Tsui, H.W., Siminovitch, K.A., De Souza, L., Tsui, F.W. 1993. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat. Genet.* **4**: 124-129.
155. Asimakopoulos, F.A., Hinshelwood, S., Gilbert, J.G., Delibrias, C.C., Gottgens, B., Fearon, D.T., Green, A.R. 1997. The gene encoding hematopoietic cell phosphatase (SHP-1) is structurally and transcriptionally intact in polycythemia vera. *Oncogene* **14**: 1215-1222.
156. Wickrema, A., Chen, F., Namin, F., Yi, T., Ahmad, S., Uddin, S., Chen, Y.H., Feldman, L., Stock, W., Hoffman, R., Platanias, L.C. 1999. Defective expression of the SHP-1 phosphatase in polycythemia vera. *Exp Hematol.* **27**: 1124-1132.
157. Heller, P.G., Lev, P.R., Salim, J.P., Kornblihtt, L.I., Goette, N.P., Chazarreta, C.D., Glembotsky, A.C., Vassallu, P.S., Marta, R.F., molinas, F.C. 2006. JAK2V617F mutation in platelets from essential thrombocytemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. *Eur. J. Haematol.* **77**: 210-216.
158. Walsh, K., Perlman, H. 1997. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 597-602.
159. Olson, E.N., Klein, W.H. 1994. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes & Dev.* **8**: 1-8.
160. Davis, R.L., Cheng, P., Lassar, A.B., Weintraub, H. 1990. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle specific gene activation. *Cell* **60**: 733-746.
161. Weintraub, H. 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks and thresholds. *Cell* **75**: 1241-1244.
162. Buckingham, M. 1994. Molecular biology of muscle. *Cell* **78**: 15-21.
163. Kitzmann, M., Fernandez, A. 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 571-579.
164. Olson, E.N., Perry, M., Schulz, R.A. 1995. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* **172**: 2-14.

165. Black, B.L., Molkenin, J.D., Olson, E.N. 1998. Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol. Cell. Biol.* **18**:69-77.
166. Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., Weintraub, H. 1990. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**: 49-59.
167. Norton, J.D., Deed, R.W., Craggs, G., Sablitzky, F.1998. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol.* **8**: 58-65.
168. Taya, Y. 1997. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 14-17.
169. Chelappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., Nevins, J.R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target of the RB protein. *Cell* **65**: 1053-1061.
170. Helin, K. 1998. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 28-35.
171. Mittnacht, S. 1998. Control of pRb phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 21-27.
172. Sherr, C.J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551-555.
173. Quelle, D., Ashmun, R., Shurtleff, S., Kato, J. 1993. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* **7**: 1559-1571.
174. Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R.C., Walsh, K. 1995. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3823-3829.
175. Zhang, H., Hannon, G.J., Beach, D. 1994. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* **8**: 1750-1758.
176. Reynaud, E.G., Guiller, M., Leibovitch, M.P., Leibovitch, S.A. 2000. Dimerization of the amino-terminal domain of p57kip2 inhibits cyclin D1-cdk4 kinase activity. *Oncogene* **19**: 1147-1152.
177. Pavlath, G.K., Horsley, V. 2003. Cell fusion in skeletal muscle. Central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *Cell Cycle* **2**: 420-423.

178. Abmayr, S.M., Balagopalan, L., Galletta, B.J., Hong, S.J. 2003. Cell and molecular biology of myoblast fusion. *Int. Rev. Cytol.* **225**: 33-89.
179. Yun, B.G., Matts, R.L. 2005. Differential effects of Hsp90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. *Exp. Cell. Res.* **307**: 212-223.
180. Rosoff, W.J., Swope, S.L. 2002. Role for cellular Src kinase in myoblast proliferation. *J. Cell. Physiol.* **193**: 328-339.
181. Laprise, P., Poirier, E.M., Vezina, A., Rivard, N., Vachon, P.H. 2002. Merosin-integrin promotion of skeletal myofiber cell survival: differentiation state-distinct involvement of p60Fyn tyrosine kinase and p38 $\alpha$  stress-activated MAP kinase. *J. Cell. Physiol.* **191**: 69-81.
182. Ni, M., Lee, A.S., 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* **581**: 3641-3651.
183. Lee, A.S., 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 504-510.
184. Asquith, K.L., Baleato, R.M., McLaughlin, E.A., Nixon, B., Aitken, R.J. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface cheperones facilitating sperm-zona recognition. *J. Cell Sci.* **117**: 3645-3657.
185. Knowlton, A.A., Grenier, M., Kirchhoff, S.R., Salfity, M. 2000. Phosphorylation at tyrosine-524 influences nuclear accumulation of HSP72 with heat stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**: H2143-H2149.
186. Kang, H.S., Welch, W.J., 1991. Characterization and purification of the 94-kDa glucose-regulated protein. *J. Biol. Chem.* **266**: 5643-5649.
187. Reddy, R.K., Lu, J., Lee, A.S., 1999. The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca(2+)-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 28476-28483.
188. Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T., Hendershot, L.M. 2002. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell.* **13**: 4456-4469.

189. Srivastava, P., 2002. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 395-425.
190. Altmeyer, A., Maki, R.G., Feldweg, A.M., Heike, M., Protopopov, V.P., Masur, S.K., Srivastava, P.K. 1996. Tumor-specific cell surface expression of the -KDEL containing endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int. J. Cancer* **6**: 9340-9349.
191. Lambert, C., Prange, R. 2003. Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 5199-5204.
192. Itoh, S., Lemay, S., Osawa, M., Che, W., Duan, Y., Tompkins, A., Brookes, P.S., Sheu, S.S., Abe, J. 2005. Mitochondrial Dok-4 recruits Src kinase and regulates NF-kappaB activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 26383-26396.
193. Wiest, D.L., Bhandoola, A., Punt, J., Kreibich, G., McKean, D., Singer, A. 1997. Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocyte as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 1884-1889.
194. Wiest, D.L., Burgess, W.H., Punt, J., McKean, D., Kears, K.P., Singer, A. 1995. The molecular chaperone calnexin is expressed on the surface of immature thymocytes in association with clonotype-independent CD3 complexes. *EMBO J.* **14**: 3425-3433.
195. White, T.K., Zhu, Q., Tanzer, M.L. 1995. Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J. Biol. Chem.* **270**: 15926-15929.
196. Essex, D.W., Chen, K., Swiatkowska, M. 1995. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelets plasma membrane. *Blood* **86**: 2168-2173.
197. Goicoechea, S., Orr, A.W., Pallero, M.A., Eggleton, P., Murphy-Ullrich, J.E. 2000. Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J. Biol. Chem.* **275**: 36358-36368.

198. Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T., Saito, T. 2000. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **275**: 35751-35758.