



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

- Sezione di Oncologia -

Facoltà di Medicina e Chirurgia

**DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
- XXI CICLO-**

INDUZIONE DELLA FOSFATASI MKP-1 AD OPERA DI NOTCH3: RUOLO DI QUESTA PROTEINA NELL'APOPTOSI IN CELLULE DI LEUCEMIA T

Coordinatore : Ch.mo Prof.ssa Paola Zanovello

Supervisore : Dott. Stefano Indraccolo

Dottorando : Masiero Massimo

A me stesso ed alla mia Famiglia

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 <i>Leucemia linfoblastica acuta a cellule T</i>	5
1.2 <i>Notch</i>	6
1.2.1 <i>Notch signalling</i>	6
1.2.2 <i>Il Notch signalling nello sviluppo dei linfociti T e nella T-ALL</i>	8
1.2.3 <i>Il Notch signalling in altre neoplasie</i>	11
1.2.4 <i>Notch signalling ed angiogenesi</i>	12
1.3 <i>Dormienza tumorale</i>	13
1.3.1 <i>MAP chinasi e dormienza tumorale</i>	16
1.4 <i>MKP-1 (Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1)</i>	22
1.4.1 <i>MKP-1 e cancro</i>	25
1.5 <i>Un modello di dormienza tumorale</i>	26
2. SCOPO DELLA TESI	29
3. MATERIALI E METODI	30
3.1 <i>LINEE CELLULARI E TRATTAMENTI</i>	30
3.1.1 <i>Colture cellulari</i>	30
3.1.2 <i>Cellule primarie umane</i>	30
3.1.3 <i>Trattamenti in vitro delle cellule</i>	31
3.2 <i>STUDI NELL'ANIMALE</i>	32
3.2.1 <i>Manipolazione degli animali</i>	32
3.2.2 <i>"In vivo imaging" dei tumori</i>	33
3.2.3 <i>Estrazione e processamento delle masse ex vivo</i>	33
3.3 <i>ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA</i>	34
3.3.1 <i>Western Blot (W.B.)</i>	34
3.3.2 <i>Analisi dell'ubiquitinazione su immunoprecipitato anti-MKP-1</i>	36
3.3.3 <i>Analisi al microscopio confocale</i>	36
3.4 <i>ANALISI CITOFLUORIMETRICHE</i>	36
3.4.1 <i>Marcatura di superficie</i>	36
3.4.2 <i>Valutazione dell'apoptosi mediante marcatura con Annessina V/Ioduro di Propidio</i>	37
3.5 <i>ANALISI DI ESPRESSIONE A LIVELLO DI mRNA</i>	38
3.5.1 <i>Estrazione dell'RNA</i>	38
3.5.2 <i>Quantificazione dell'RNA estratto e verifica della sua qualità</i>	39
3.5.3 <i>Retrotrascrizione</i>	40
3.5.4 <i>qRT-PCR con SybrGreen</i>	40
3.6 <i>MANIPOLAZIONI GENETICHE</i>	42
3.6.1 <i>Produzione di vettori lentivirali e retrovirali</i>	42
3.6.2 <i>Trasduzione di cellule di T-ALL</i>	43
3.6.3 <i>Elettroporazione di cellule di T-ALL</i>	43
3.7 <i>CLONAGGIO DI MKP-1 IN UN VETTORE LENTIVIRALE</i>	43
3.7.1 <i>Preparazione del plasmide pCMV-MKP-1</i>	44
3.7.2 <i>Preparazione dell'insero ("coding sequence" di MKP-1)</i>	44
3.7.4 <i>Verifica della presenza dell'insero nel vettore CMV</i>	45

3.7.5	<i>Sequenziamento del vettore pCMV-MKP-1</i>	46
3.8	<i>ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE</i>	46
3.9	<i>ANALISI STATISTICA</i>	47
4.	RISULTATI	48
4.1	<i>ANALISI MOLECOLARE DI TUMORI DORMIENTI E CRESCIUTI</i>	48
4.1.1	<i>Stato di attivazione delle MAP chinasi ERK1/2 e p38</i>	48
4.1.2	<i>Analisi dei livelli di espressione della fosfatasi MKP-1</i>	49
4.2	<i>STUDIO DELLE LINEE DERIVATE DALLE DIVERSE VARIANTI TUMORALI</i>	51
4.3	<i>ESPRESSIONE DI MKP-1 ED ATTIVAZIONE DI NOTCH3 IN T-ALL</i>	52
4.4	<i>MODULAZIONE DEL SIGNALLING DI NOTCH E CONSEGUENZE SULL'ESPRESSIONE DI MKP-1</i>	53
4.4.1	<i>Effetto degli inibitori delle γ-secretasi</i>	54
4.4.2	<i>Conseguenze della stimolazione con Dll4</i>	55
4.4.3	<i>Conseguenze della modulazione del signaling di Notch3</i>	56
4.4.4	<i>Inibizione dell'interazione Dll4-Notch3 in vitro ed in vivo: effetti sui livelli di MKP-1</i>	58
4.4.5	<i>Studio del meccanismo che lega MKP-1 a Notch3 nel nostro modello</i>	59
4.5	<i>RUOLO DI MKP-1 NELL'APOPTOSI IN CELLULE DI T-ALL</i>	61
4.5.1	<i>Aumentati livelli di MKP-1 hanno un effetto protettivo nei confronti di stimoli pro-apoptotici</i>	61
4.5.2	<i>Il silenziamento di MKP-1 sensibilizza le cellule nei confronti di diversi stimoli pro-apoptotici</i>	63
4.6	<i>CONSEGUENZE DELLA MANIPOLAZIONE DI MKP-1 IN VIVO</i>	64
4.7	<i>POSSIBILI IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE</i>	67
5.	DISCUSSIONE	69
6.	BIBLIOGRAFIA	76

RIASSUNTO

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è un'emopatia maligna dei timociti caratterizzata da un alto numero di linfoblasti che rappresenta il 10-15% dei casi di leucemia in età pediatrica ed il 25% dei casi in età adulta. Tra le vie di signalling maggiormente coinvolte in questo tipo di neoplasia figura quello governato dai recettori Notch. Questa pathway evolutivamente conservata, oltre ad essere alterata in queste leucemie, ricopre un ruolo molto importante anche in diversi processi fisiologici, tra cui ricordiamo il differenziamento dei linfociti T e l'angiogenesi. Lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni è un evento centrale nello sviluppo tumorale in quanto un'insufficiente perfusione può determinare, tra l'altro, l'instaurarsi di uno stato di dormienza, una condizione caratterizzata dalla stasi prolungata della crescita tumorale.

Il presente lavoro propone di ampliare le conoscenze sul fenomeno della dormienza tumorale impiegando un modello in cui cellule di T-ALL sono in grado di sfuggire dallo stato di dormienza grazie all'attivazione del signalling di Notch3, e di indagare più in dettaglio quelli che sono i meccanismi a valle di questa attivazione. Inoltre, si è cercato di estendere le evidenze ottenute in questo modello anche ad altre cellule di T-ALL traendone anche alcune implicazioni terapeutiche.

Lo studio ha dimostrato che la condizione di uscita dalla dormienza è associata ad una diminuzione dell'attivazione delle MAP chinasi ERK1/2 e p38, confermando in parte dati di letteratura che descrivono il coinvolgimento di queste vie di signalling nel fenomeno della dormienza tumorale. Parallelamente a questo spegnimento delle MAP chinasi è stato rilevato un aumento dei livelli della fosfatasi MKP-1. Abbiamo quindi dimostrato che l'incremento di questa ultima è indotto dall'attivazione di Notch3, attraverso un meccanismo basato sulla riduzione dell'ubiquitinazione di MKP-1 e quindi sulla conseguente stabilizzazione della proteina.

E' stato successivamente indagato il ruolo di questa fosfatasi nel nostro modello, dimostrando che la sua overespressione da sola non è sufficiente a interrompere lo stato di dormienza, ma che, nonostante questo, risulta essere comunque importante nelle prime fasi di crescita tumorale. Questo suo ruolo sembra essere legato alla capacità di MKP-1 di proteggere le cellule di T-ALL dall'apoptosi, sia in condizioni di stress cellulare che a seguito di trattamento con alcuni chemioterapici.

In conclusione, le nostre ricerche hanno individuato nella fosfatasi MKP-1 uno degli effettori dell'attività anti-apoptotica e di Notch3 che, nel nostro modello, sembra essere coinvolta nell'uscita dalla condizione di dormienza tumorale. Abbiamo inoltre dimostrato che l'azione di Notch3 è mediata da un meccanismo atipico per questa classe di recettori, molto più comunemente coinvolti nella regolazione della trascrizione genica. In ultimo, abbiamo dimostrato le rilevanti capacità anti-apoptotiche di MKP-1, formulando quindi l'ipotesi che l'espressione di questa proteina possa avere anche un significato traslazionale per la terapia delle T-ALL.

ABSTRACT

T cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) is a thymocyte's derived malignant disease characterized by an abnormal lymphoblast numbers that represents 10-15% of all leukaemias in childhood and 25% in adulthood. The Notch pathway has been involved in the pathogenesis of this disease. This is an evolutionary conserved pathway involved not only in leukaemia biology but also in different physiologic processes, including T cell differentiation and angiogenesis. New blood vessels development is mandatory to foster tumor growth, because insufficient perfusion can induce the establishment of a state of dormancy, a condition characterized by sustained tumor latency.

The present thesis work tries to expand our knowledge on the mechanisms involved in regulation of tumor dormancy by exploiting a T-ALL model where escape from dormancy is due to activation of Notch3 signalling induced by angiogenesis. We investigated the mechanisms downstream to this activation. Moreover, we tried to extend our findings to other T-ALL cells in order to draw some therapeutic implications.

This study demonstrated that escape from tumor dormancy is connected with low activation of MAPKs ERK1/2 and p38, in part confirming literature data describing the involvement of this signalling pathway in dormancy. In parallel to MAPKs silencing we found an increase in MKP-1 expression, a phosphatase known to target ERK1/2 and p38 by inhibiting their activity. We demonstrated that MKP-1 upregulation is induced by Notch3 activation through a mechanism based on reduction of its ubiquitination and protein degradation.

We further investigated the role of MKP-1 in our model, demonstrating that its overexpression is not sufficient to prevent tumor dormancy, but yet MKP-1 expression is important in early phases of tumor growth. This role seems to be linked to MKP-1 anti-apoptotic properties following challenge of T-ALL cells with serum starvation and some chemotherapeutic drugs.

In conclusion, our findings describe on MKP-1 phosphatase as one key effector of the anti-apoptotic activities of Notch3 that, in our model, regulates escape from dormancy. We also demonstrated that Notch3 control of MKP-1 levels is mediated by protein stabilization, an uncommon mechanism for this class of receptors usually involved in gene expression regulation.

Finally, we confirmed the strong anti-apoptotic properties of MKP-1 in T-ALL cells, a finding which could have therapeutic implications.

1. INTRODUZIONE

1.1 Leucemia linfoblastica acuta a cellule T

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è un'emopatia maligna dei timociti caratterizzata da un alto numero di linfoblasti T circolanti e nel midollo. Rappresenta il 10-15% dei casi di leucemia in età pediatrica ed il 25% dei casi in età adulta; comprende diversi sottotipi che sembrano corrispondere a stadi differenziativi diversi dei linfociti T. Evidenze genetiche e funzionali suggeriscono che siano quattro i tratti cellulari alterati che portano allo sviluppo di timociti maligni: ciclo cellulare, differenziazione, proliferazione e sopravvivenza, capacità di auto-rinnovarsi. Contrariamente alle leucemie mieloidi e a quelle a cellule B, le T-ALL sono raramente caratterizzate da traslocazioni cromosomiche ricorrenti, che nella maggioranza dei casi coinvolgono loci del TCR (T Cell Receptor) ^{1, 2} e solo marginalmente risultano utili nella selezione della terapia. Il TCR viene però utilizzato per la classificazione delle T-ALL: i pazienti vengono infatti classificati come pazienti con T-ALL che esprime TCR (TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$), pazienti con T-ALL pre- $\alpha\beta$ (TCR β^+ , TCR $^-$) e pazienti con T-ALL immature (TCR β^- , TCR $^-$).

Inoltre, è stato recentemente riportato che la maggior parte dei geni implicati nella patogenesi delle T-ALL è soggetta a modificazioni epigenetiche che ne determinano l'aumentata espressione. Tra i geni principalmente interessati da queste alterazioni ricordiamo HOX11, TAL1, TAL2, LYL, BHLHB1, LMO1 e 2 e, in rari casi, LCK e la forma tronca del gene Notch1/TAN ³. E' importante sottolineare che tali geni sono tutti implicati in diverse tappe del differenziamento intra-timico dei linfociti T. L'insieme di queste osservazioni suggerisce che una deregolazione dello sviluppo precoce dei linfociti T può condurre alla trasformazione neoplastica di queste cellule.

La via di trasduzione del segnale di Notch negli ultimi anni ha attirato su di sé l'attenzione dei ricercatori per il suo coinvolgimento nella genesi di tali leucemie. La sua attivazione costitutiva nei progenitori ematopoietici, pur inibendo il corretto sviluppo sia dei linfociti T che B, porta però esclusivamente a neoplasie a cellule T e mutazioni di Notch1 o a carico di proteine coinvolte nella regolazione del signalling di questo recettore sono state riscontrate in oltre il 50% dei pazienti affetti da T-ALL ⁴.

1.2 Notch

1.2.1 Notch signalling

Il pathway di Notch è un meccanismo conservato evolutivamente che controlla una vasta gamma di processi cellulari inclusi il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi. I segnali trasdotti dal recettore Notch controllano le risposte della cellula a stimoli intrinseci ed estrinseci e necessitano del contatto tra due cellule adiacenti. Il gene che codifica per il recettore Notch è stato scoperto in *Drosophila melanogaster* 80 anni fa, poiché la parziale perdita di funzione risultava in un fenotipo con i margini delle ali intaccati ⁵. Il gene NOTCH codifica per una proteina di circa 300 kDa sintetizzata nel reticolo endoplasmatico in una forma inattiva che viene processata proteoliticamente da una furin-proteasi nel network del trans-Golgi, generando un frammento extracellulare (NEC) ed un frammento transmembrana (NTM). Questi due frammenti, legati uno all'altro in modo non covalente attraverso il dominio di eterodimerizzazione (HD), sono poi presentati come recettore di membrana a singolo passo. Il dominio extracellulare consiste principalmente in un numero variabile (29-36) di sequenze aminoacidiche ripetute (repeats) simili al fattore di crescita dell'epidermide (EGF) attraverso cui il recettore prende contatto con i suoi ligandi. Inoltre questo dominio possiede una regione (CR) costituita da una serie di "repeats" ricchi in cisteina (Notch/LIN-12), importanti per la struttura nativa della proteina e per prevenire l'attivazione ligando-indipendente del recettore ⁶.

Nel dominio intracellulare sono stati individuati 6 "repeats" ANK, un dominio ricco di glutammina ed una sequenza PEST. Il legame di un ligando a NEC induce due tagli sequenziali del recettore Notch. Il primo determina la perdita del dominio extracellulare e la formazione di un frammento intermedio legato alla membrana chiamato Notch extracellulare troncato (NEXT). Tale taglio è effettuato da una famiglia di metalloproteasi chiamata ADAM. Questo nuovo frammento viene poi ulteriormente processato proteoliticamente da una γ -secretasi dipendente dalla presenilina portando al rilascio della porzione intracellulare del Notch (NICD) dalla membrana. NICD possiede due sequenze di localizzazione nucleare e viene quindi traslocato all'interno del nucleo dove agisce da fattore trascrizionale interagendo col fattore di trascrizione RBP-J κ (anche conosciuto come CBF1 o CSL) ed altre proteine come MAML1 (mastermind-like 1) e p300 ⁷. Il NICD contiene poi un importante dominio regolatorio chiamato

PEST che è fondamentale per la stabilità della proteina e la degradazione attraverso il proteasoma ⁸.

Nei vertebrati superiori la famiglia del Notch è composta da quattro membri: Notch1 e Notch2, molto simili tra loro, mentre Notch3 e Notch4 sono differenti da primi due sia nel dominio extracellulare che in quello intracellulare. Sono stati identificati 5 ligandi per i recettori Notch: Jagged/Serrate 1, 2 e Delta-like (Dll) 1, 2 e 4 ⁹. La molteplicità dei recettori Notch e dei ligandi che li attivano pone la questione della specifica funzione di ognuno di loro.

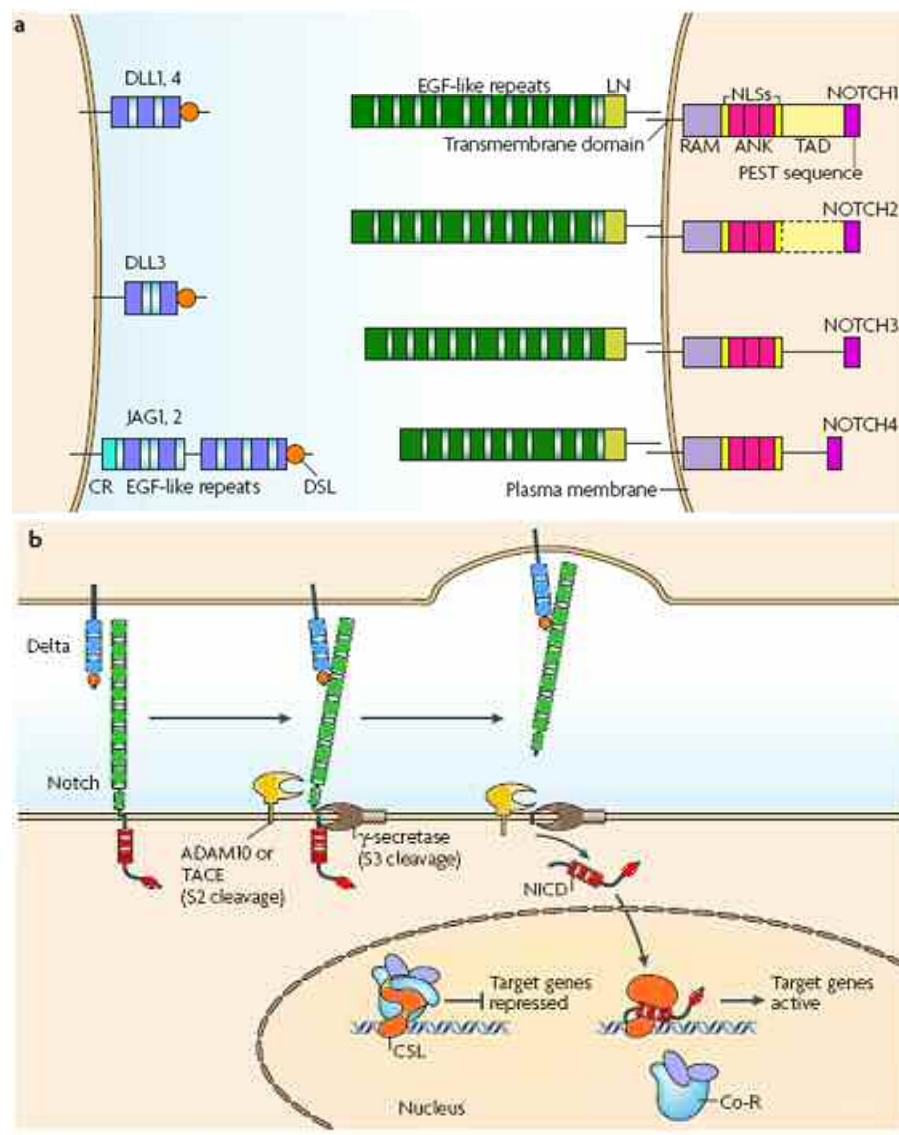


Figura 1. Schema generale del signalling dei recettori Notch ¹⁰.

1.2.2 Il Notch signalling nello sviluppo dei linfociti T e nella T-ALL

Notch è implicato in molte vie che riguardano le fasi dello sviluppo dei linfociti T ^{11, 12}: controlla la generazione di cellule T o cellule B dai progenitori delle cellule linfoidi ¹³, agisce allo stadio di biforcazione $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$, regola la decisione dei timociti di divenire cellule T CD4⁺ helper o CD8⁺ killer; ed infine controlla la suscettibilità delle cellule T all'apoptosi (fig.2) ^{14, 15}.

Lo sviluppo dei linfociti T inizia nel timo, un organo linfoide primario che possiede un microambiente unico per lo sviluppo dei progenitori ematopoietici multipotenti (CLP). La differenziazione in cellule T mature prevede riarrangiamenti di differenti geni del TCR ed eventi di selezione positiva e negativa che portano poi all'espressione di TCR $\alpha\beta$ -TCR $\gamma\delta$ maturi ed in grado di riconoscere peptidi "non-self" presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Questo processo passa attraverso una serie discreta di stadi fenotipici che sono distinti per l'espressione di molecole di membrana. I più precoci precursori timici non hanno espressione né di CD4 né di CD8 e sono definiti come doppi negativi (DN). La popolazione di DN può essere ulteriormente divisa in consecutivi stadi di sviluppo, nel topo questo avviene in base all'espressione del CD44 e della catena α del recettore dell'IL-2 (CD25): DN1 (CD44⁺ CD25⁻), DN2 (CD44⁺ CD25⁺), DN3 (CD44⁻ CD25⁺), DN4 (CD44⁻ CD25⁻); nell'uomo si usano come marcatori CD34 e CD1a: cellule CD34⁺ CD1a⁻ corrispondono allo stadio DN1-DN2 e cellule CD34⁺ CD1a⁺ sono omologhe a cellule DN3 ¹⁶. La popolazione umana DN4 è difficilmente distinguibile dai timociti appartenenti allo stadio differenziativo successivo di singoli positivi (ISP) caratterizzato da CD4⁺ CD3⁻. Poiché il numero di progenitori che entrano nel timo è limitato, c'è un'espansione durante gli stadi DN1 e DN2. Nello stadio DN3 le cellule smettono di proliferare ed incominciano a riarrangiare i loci TCRB attivando i geni che determinano la ricombinazione (RAG1/2), portando ad una catena TCR β completa durante lo stadio DN4/ISP. Quando i timociti si differenziano in cellule ISP, la funzionalità della catena TCR β è consentita dall'assemblaggio sulla superficie cellulare con un surrogato della catena α , detta pre-TCR α (pTalfa), ed il CD3 a formare un pre-TCR completo: questo processo è chiamato selezione β . L'espressione del pre-TCR promuove la sopravvivenza e la proliferazione dei timociti DN4/ISP, l'inibizione di ulteriori riarrangiamenti dei loci TCRB, l'inizio dei riarrangiamenti dei loci TCRA ed il differenziamento in cellule DP (CD4⁺ CD8⁺). Per spiegare l'esistenza del pTalfa sono stati proposti due possibili scenari: si suppone che il pTalfa sia comparso evolutivamente dopo il TCR $\alpha\beta$ per la selezione β oppure si

pensa che, prima dell'evoluzione del TCR α , l'eterodimero pTalfa/ TCR β formasse un recettore per l'antigene immunocompetente. Dati ottenuti da esperimenti condotti usando topi transgenici per TCR α e pTalfa sono in favore della seconda ipotesi ¹⁵. Questo porta a due conseguenze: il pre-TCR potrebbe essere in grado di mediare il riconoscimento delle molecole MHC self ed i timociti che esprimono costitutivamente il pre-TCR potrebbero passare la selezione intratimica e maturare in linfociti T maturi. Il riarrangiamento produttivo dei loci per il TCR α porta all'espressione di un complesso TCR $\alpha\beta$ che viene testato sia per l'assenza di reattività contro antigeni self (selezione negativa) sia per la capacità di riconoscere le varianti alleliche delle molecole MHC presenti nella popolazione (selezione positiva). La selezione positiva è associata all'up-regolazione dell'espressione sulla superficie cellulare di TCR $\alpha\beta$ /CD3, alla down-regolazione trascrizionale di pTalfa e alla ridotta espressione dei marker di immaturità delle cellule T. Circa il 95% dei timociti che si sono differenziati muore per apoptosi, i restanti diventano cellule SP che maturano in linfociti helper CD4⁺ o in linfociti citotossici CD8⁺ e migrano dal timo come linfociti T naive circolanti.

La via di trasduzione del Notch è variamente coinvolta durante tutte le fasi del differenziamento dei precursori ematopoietici in linfociti T maturi ^{11, 12, 15, 17, 18}. Notch1 è attivo nel polarizzare il differenziamento dei CLP in precursori delle cellule T piuttosto che delle cellule B, favorisce lo sviluppo del TCR $\alpha\beta$ rispetto al TCR $\gamma\delta$ ed il passaggio dei timociti DP a linfociti citotossici CD8⁺. Notch3 regola l'espressione del pTalfa nella fase DN4/ISP. I ligandi che attivano Notch, soprattutto Jagged/Serrate 1 e 2 e Delta-like 1 e 4, sono espressi sia sulla membrana delle cellule stromali che dalle cellule epiteliali timiche. Recenti studi hanno dimostrato che tra questi ligandi, Dll4 sembra giocare un ruolo fondamentale nello sviluppo dei linfociti T. Infatti, topi "Knock Out" (KO) per l'espressione di Dll4 nelle cellule epiteliali del timo, sono caratterizzati dalla scomparsa delle cellule DP e SP per CD4 e CD8. La presenza di queste cellule ed il normale sviluppo di linfociti T possono però essere recuperati tramite l'espressione nelle cellule ematopoietiche del NICD di Notch1 ¹⁹. Quando i CLP, che esprimono Notch, entrano nel microambiente timico ed interagiscono con i ligandi di questi recettori, incominciano immediatamente ad esprimere i geni bersaglio di Notch. L'espressione dei differenti ligandi e dei loro recettori in maniera stadio e tessuto-specifica indica la possibilità di una funzione univoca per entrambi ²⁰.

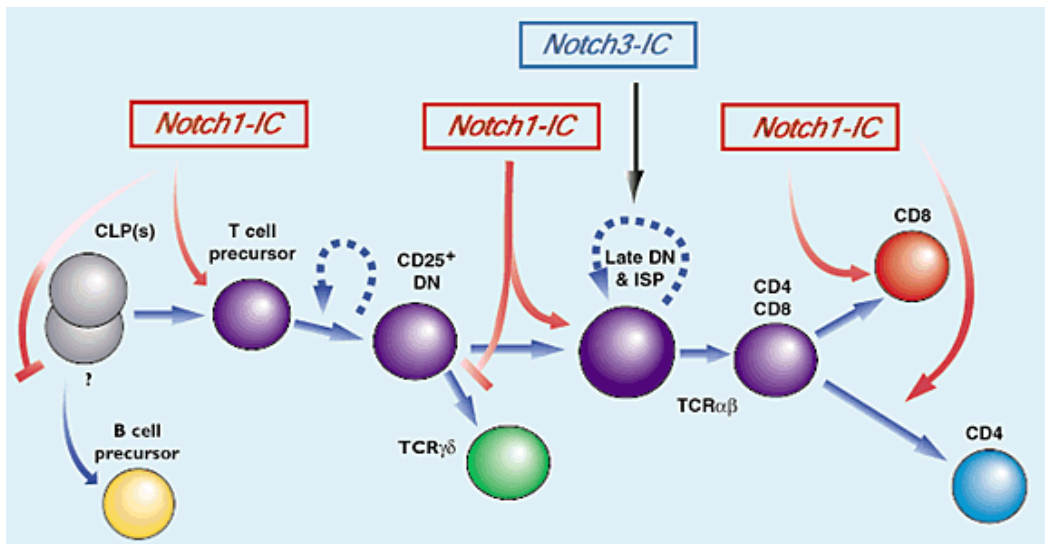


Figura 2. Ruolo dei membri della famiglia Notch negli stadi di sviluppo dei timociti ¹⁴.

La capacità trasformante del signalling di Notch è dovuta alla sua capacità di regolare due importanti processi che governano la biologia della cellula: la progressione nel ciclo cellulare e l'apoptosi. Notch è infatti in grado di favorire la transizione G₁-S regolando direttamente le cicline di tipo D ²¹, inducendo la degradazione di p27 ²² e transattivando c-myc ²³⁻²⁵. L'attivazione di Notch è inoltre in grado di impedire la stabilizzazione di p53 attraverso la riduzione dei livelli di ARF, ostacolando così un importante meccanismo nella risposta apoptotica ²⁶.

Diversi modelli animali hanno dimostrato la capacità oncogenica di Notch nello sviluppo di leucemie a cellule T ^{27, 28, 29}, ma solo nel 1991 è stata osservata la prima alterazione genetica a carico di Notch, una traslocazione t(7;9)(q34;q34.3) in cui una parte di NOTCH1 era fusa con il locus TCRB e si è compresa l'importanza di Notch1 per la genesi delle leucemie a cellule T nell'uomo ⁴. La traslocazione (7;9) porta ad un'espressione aberrante di Notch1 (originariamente definito come oncogene TAN1) e si trova in meno dell'1% delle T-ALL. Mutazioni attivanti di Notch1 sono state però individuate in oltre il 56% delle T-ALL ⁴. Queste mutazioni sono principalmente di due tipi: possono coinvolgere il dominio di eterodimerizzazione (HD) favorendo il taglio proteolitico del recettore in modo ligando-indipendente ^{4, 30}; oppure interessano il dominio di regolazione PEST, determinando un aumento dell'emivita della proteina a causa della ridotta interazione con l'E3 ubiquitina ligasi Fbw7 ³¹. Entrambe le mutazioni portano quindi ad un aumentato livello di NICD e dell'espressione dei geni da esso regolati.

La gran parte delle evidenze indica Notch1 come maggiore protagonista all'interno di questa famiglia di recettori per quanto riguarda la patogenesi delle T-ALL. Tuttavia, anche Notch3, seppure non siano note sue mutazioni, è stato trovato espresso ad elevati livelli in una percentuale elevata di campioni di T-ALL umane ed un ridotto livello di espressione si accompagna alla remissione clinica ³². E' importante notare come Notch3 sia stato trovato tra i geni attivati da Notch1 in cellule di T-ALL. Questa scoperta, solleva l'importante questione su quali siano le conseguenze dirette dell'attivazione di Notch1 e quali siano invece quelle mediate da Notch3 ²⁵.

1.2.3 Il Notch signalling in altre neoplasie

Nonostante una gran mole di informazioni sul ruolo di Notch in ambito neoplastico derivino da studi fatti sulla T-ALL, molte nuove evidenze stanno evidenziando come questa via di signalling possa essere coinvolta anche nella genesi di molti tumori solidi. E' stato dimostrato che alterazioni attivanti a carico di Notch4 sono in grado di indurre tumori della mammella nel topo ³³ mentre in ambito umano abbiamo, per ora, solo evidenze correlative. Infatti, circa due terzi dei carcinomi duttali *in situ* risultano essere positivi per l'espressione di Notch1 ³⁴ mentre l'espressione di questo stesso recettore e del ligando Jagged1 correlano in generale con una prognosi peggiore nelle pazienti colpite da tumore alla mammella ³⁵. L'idea che Notch1 possa avere una certa importanza in questa patologia è rinforzata anche dall'evidenza che circa il 50% dei carcinomi mammari, in particolare i più aggressivi, sono caratterizzati dalla perdita dell'espressione di Numb, una proteina regolatrice del signalling di Notch, e che questo è associato ad elevati livelli di NICD, ad una elevata proliferazione e ad un grado tumorale maggiore ³⁶. Studi di espressione hanno evidenziato un'aumentata espressione di Notch2 nel medulloblastoma umano. Il possibile ruolo di questo recettore è sostenuto anche da dati sperimentali nel topo ed *in vitro* che dimostrano come l'inibizione di questa pathway induca apoptosi mentre l'aumento del Notch2-ICD (ma non Notch1-ICD) è in grado di promuovere la proliferazione e la crescita tumorale ^{37, 38}. Studi di espressione genica e di immunohistochemica hanno evidenziato l'espressione dei recettori Notch e dei loro ligandi in lesioni primarie di melanoma umano. Anche in questo caso, studi sperimentali hanno dimostrato come l'inibizione di questa via abbia effetti inibitori sulla crescita tumorale mentre l'attivazione costitutiva promuove la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali ³⁹⁻⁴¹. Evidenze di un possibile ruolo di Notch si

stanno accumulando anche in altre neoplasie tra cui il carcinoma del colon e del pancreas ⁴²⁻⁴⁴.

1.2.4 Notch signalling ed angiogenesi

Nell'adulto i vasi sanguigni della maggior parte degli organi sono quiescenti. Questo non è però vero durante la crescita dei tumori, durante la quale vie di signalling, altrimenti specifiche delle fasi embrionali dello sviluppo dell'organismo, guidano la crescita di nuovi vasi sanguigni attorno ed all'interno della massa tumorale. Tra queste, un ruolo importante è giocato dalla pathway del Notch, sia a livello embrionale che durante la patologia neoplastica. Svariati studi genetici hanno dimostrato l'importanza di questa via, evidenziando come la mancanza di alcuni suoi componenti, tra cui Notch1, Jagged1, Dll1 e 4, abbiano come conseguenza difetti nel rimodellamento vascolare che portano a morte in fase di sviluppo embrionale ^{45, 46}. L'aploinsufficienza di Dll4 risulta anche essa letale a causa di gravi difetti vascolari ⁴⁷. Il fatto che l'espressione forzata del Notch4-ICD in cellule endoteliali abbia le stesse conseguenze del silenziamento di Notch1 o di Notch1 e 4 contemporaneamente, suggerisce che esista un intervallo determinato nel livello di attivazione di questa via all'esterno del quale l'angiogenesi non può avvenire in modo corretto e completo ⁴⁸.

Recentemente diversi gruppi hanno dimostrato l'importanza di questa via nell'angiogenesi tumorale. E' stato dimostrato che l'mRNA codificante Dll4 è aumentato nella vascolatura di xenotrapianti tumorali umani in topo, in campioni neoplastici umani primari ed in condizioni di ipossia ⁴⁹. L'importanza di questo ligando nel regolare l'angiogenesi è stata recentemente dimostrata da alcune importanti pubblicazioni. Il blocco dell'attività di questa proteina si è dimostrato in grado di inibire la crescita di diversi tumori solidi nel topo. Questo promettente risultato terapeutico risulta essere associato ad un aumentato numero di vasi sanguigni in seguito ad un incremento dello "sprouting" e del "branching" vascolari. Tali vasi risultano però essere poco funzionali a causa del loro ridotto stato maturativo, fenomeno che ha come conseguenza una peggiore irrorazione della massa neoplastica ⁵⁰⁻⁵⁵.

1.3 Dormienza tumorale

Una cellula tumorale passa attraverso una serie di mutazioni che la portano ad assumere caratteristiche peculiari: diventa autosufficiente per i segnali di crescita grazie all'attivazione di oncogeni ed alla perdita di geni oncosoppressori, risulta insensibile ai segnali di blocco della crescita e non responsiva agli stimoli apoptotici, acquista capacità replicativa illimitata e potenziale angiogenico ⁵⁶.

Cellule che hanno subito una trasformazione neoplastica possono andare incontro a tre destini: possono crescere in maniera continua, senza restrizioni, fino allo sviluppo di un tumore; possono essere eliminate con meccanismi apoptotici o dall'intervento del sistema immunitario; infine le cellule tumorali possono rimanere quiescenti in vari tessuti senza dare sintomi clinici. Quest'ultimo fenomeno, chiamato dormienza tumorale, è definito come condizione in cui sono presenti cellule tumorali che non crescono per un lungo periodo di tempo ed è stato osservato in differenti tipi di cancro tra cui il cancro al seno ⁵⁷⁻⁵⁹ ed il melanoma ⁶⁰. Nel contesto della latenza, il periodo che intercorre tra la comparsa della cellula neoplastica e la fase clinicamente evidente di un tumore, si descrivono due condizioni: la presenza di neoplasie non evidenziabili (UPC, unknown primary cancer) e la trasmissione di cellule neoplastiche occulte in seguito a trapianto d'organo da un donatore libero da neoplasia. Il primo caso di dormienza tumorale è piuttosto comune: la presenza di una neoplasia primitiva non rilevabile è stata stimata interessare il 5% dei pazienti ospedalizzati ⁶¹, ed in buona parte dei casi la diagnosi è solamente autoptica. Infatti, autopsie condotte su persone morte per trauma hanno rivelato microscopiche colonie di cellule tumorali, chiamate comunemente tumori *in situ*. E' stato stimato che più di un terzo delle donne tra i 40 ed i 50 anni decedute per cause indipendenti dal cancro rivelano, al momento dell'autopsia, tumori *in situ* al seno, nonostante la diagnosi di cancro al seno riguardi solo l'1% delle donne in questa fascia d'età. Un'osservazione analoga è stata fatta per il cancro alla prostata nell'uomo. Inoltre, virtualmente tutti gli individui sottoposti ad autopsia tra i 50 ed i 70 anni presentano carcinomi *in situ* nella tiroide, a fronte di uno 0,1% di pazienti con diagnosi per questo tipo di cancro ⁶². Per quello che riguarda la trasmissione di tumori solidi in seguito al trapianto d'organo da donatori che avevano avuto una neoplasia, ma che al momento dell'espianto erano liberi da malattia, sono riportati in letteratura diversi casi tra cui quello di un paziente che aveva sviluppato metastasi da carcinoma squamoso

a circa 8 mesi da un trapianto di rene da un donatore affetto da carcinoma della laringe⁶³.

Sono state proposte diverse forme di dormienza tumorale, una delle quali potrebbe essere determinata da singole cellule tumorali o micrometastasi che rimangono quiescenti⁶⁴. Il fenomeno metastatico è caratterizzato da alcune cellule neoplastiche che lasciano il tumore dopo eventi di proteolisi, infiltrano ed invadono il sistema circolatorio, migrano poi ad un nuovo sito dove aderiscono alla parete dei capillari⁶⁵. A questo punto le micrometastasi, cellule tumorali isolate o piccoli cluster di cellule neoplastiche, possono crescere nella nuova sede o rimanere in uno stato di dormienza tumorale (Fig. 3)⁶⁶. Ci sono prove che pazienti con tumori allo stato iniziale, senza evidenze cliniche di diffusione, hanno cellule tumorali nel midollo osseo. Il ritrovamento di cellule tumorali dormienti nel midollo di pazienti che hanno neoplasie che generalmente non metastatizzano nello scheletro (ad es. cancro al colon) ha suggerito che il midollo fosse un sito ottimale per lo stabilirsi dello stato di dormienza tumorale. Apparentemente queste cellule non sono in grado di proliferare autonomamente. Infatti, in studi condotti su linee di melanoma e di carcinoma mammario altamente metastatiche iniettate nella vena mesenterica, si è osservato che solo una piccola quota di micrometastasi, stimata intorno allo 0,02%, procede nella crescita fino a formare una macrometastasi. Con l'impiego di saggi per determinare l'apoptosi (TUNEL) e la proliferazione (Ki-67) è stato dimostrato che il 95% delle cellule solitarie osservate non si trovava in apoptosi e non proliferava, era cioè in uno stato di dormienza. Questa situazione potrebbe spiegare la resistenza alla chemioterapia delle micrometastasi e l'importanza dello sviluppo di terapie indipendenti dallo stato proliferativo della cellula bersaglio.

La percentuale di sopravvivenza delle cellule tumorali durante la progressione metastatica sembrerebbe indicare che la crescita delle cellule dopo l'uscita dai vasi sanguigni sia considerevolmente meno efficiente delle fasi a monte (sopravvivenza nella circolazione, arresto ed extravasazione). Per questo motivo le due variabili che contribuirebbero al destino delle metastasi sembra siano la proporzione di cellule che iniziano la crescita e la proporzione delle micrometastasi che possono persistere e formare macrometastasi.

Un importante tipo di dormienza tumorale è il risultato della mancanza di angiogenesi nei tumori solidi, che induce una riduzione dei nutrienti necessari alla neoplasia per crescere⁶⁷. Generalmente si è portati a pensare che un tumore sia una massa di cellule

proliferanti che tendono a crescere e ad espandersi. In realtà la maggior parte delle cellule all'interno di un tumore non progrediscono attraverso il ciclo cellulare: alcune sono allo stadio terminale di differenziazione, altre muoiono per necrosi o apoptosi o hanno un blocco nella crescita. Quando la proliferazione cellulare è bilanciata dalla morte cellulare, dalla differenziazione o dall'arresto del ciclo, il tumore cessa di crescere. Poiché il limite di diffusione dell'ossigeno è approssimativamente 100 μm ed i tumori non-angiogenici non sono in grado di reclutare nuovi vasi sanguigni, la grandezza del tumore dormiente è al massimo di 1 mm di diametro. Durante la fase non angiogenica il tempo di crescita e di raddoppiamento dell'intero tumore può arrivare ad essere nell'ordine degli anni. Questo però, a differenza di quanto visto nelle micrometastasi, non significa che le cellule tumorali stiano proliferando lentamente o che si trovino in fase G_0 . Infatti, in modelli di dormienza tumorale basati sull'osteosarcoma umano (MG-63 e SAOS-2) o sul carcinoma gastrico (ST-2), i tumori non erano in grado di crescere oltre una certa soglia a causa dell'equilibrio tra morte e proliferazione cellulare.

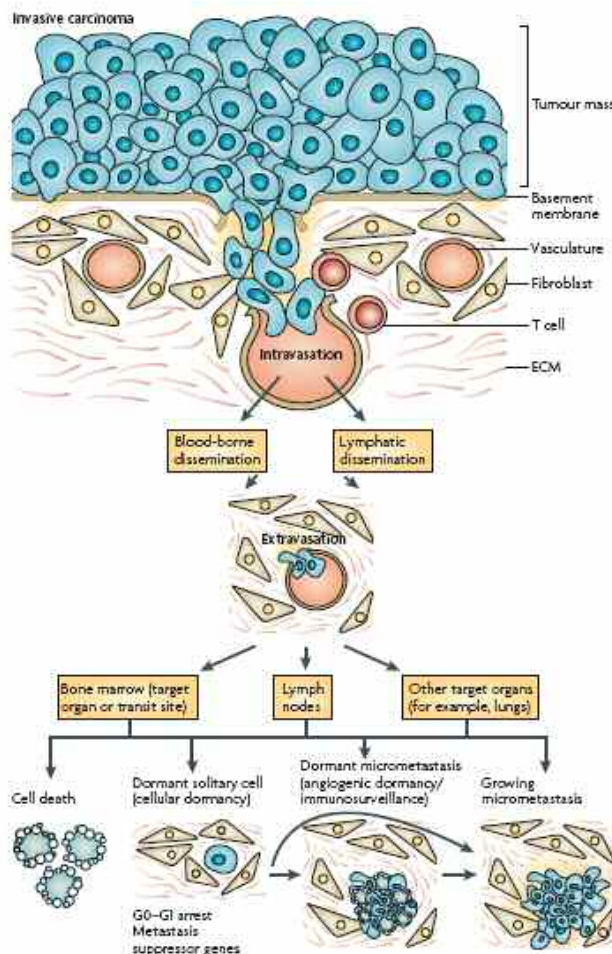


Figura 3. Schema dei possibili destini a cui una cellula metastatica può andare incontro.

Una singola cellula tumorale che dissemina nell'organismo può andare incontro a diversi destini: **1)** può morire; **2)** può attecchire in una nuova sede ma non proliferare e rimanere dormiente; **3)** può attecchire e riuscire a proliferare ma, a causa dell'incapacità di indurre angiogenesi o per l'intervento del sistema immunitario, può dare origine solo a micrometastasi dormienti; **4)** può attecchire e crescere in modo incontrollato dando in fine origine ad una macrometastasi⁶⁸.

1.3.1 MAP chinasi e dormienza tumorale

Le MAPK (mitogen activated protein kinases) sono una famiglia di protein chinasi la cui funzione e regolazione si è conservata nel corso dell'evoluzione, essendo presenti sia negli organismi unicellulari che negli organismi più complessi come l'uomo ⁶⁹. Nelle cellule normali in assenza di stimoli, le MAPKs presentano una ridotta attività catalitica. In seguito all'esposizione della cellula a ligandi extracellulari, fattori di crescita e stress, l'attività di tali enzimi può aumentare di 1000 volte. Nella maggior parte dei casi, la risposta cellulare a questi stimoli è mediata da proteine monomeriche come Ras, Rac e Cdc42. Tali proteine, una volta attivate, legano il GTP, si associano e attivano Ser/Thr chinasi come Rafs, MEKKs, MTK e ASK, note come MAPK kinase kinases (MAPKKKs). Tali MAPKKKs fosforilano e attivano specifiche MAPKKs, delle chinasi caratterizzate da una duplice specificità in quanto sono in grado di fosforilare le MAPKs a livello di specifici residui di Treonina (T) e Tirosina (Y), attivandole. Le MAPKKs e le MAPKKKs non sono specifiche solo per un particolare substrato, ma contribuiscono alla formazione di un cross-talk tra le cascate di chinasi.

La famiglia delle MAPK comprende tre sottofamiglie: ERK (extracellular signal-regulated kinases) che include ERK1 (p44^{MAPK}) ed ERK2 (p42^{MAPK}); JNK1, 2, 3 (c-Jun NH₂ terminal kinases); p38 α , β , γ e δ ed ERK5. Le sottofamiglie JNK e p38 sono state inizialmente descritte come "stress-activated protein kinases" (SAPK) ⁷⁰. Le MAPKs sono costituite da un omodimero dal peso molecolare di circa 80 kDa, sono caratterizzate dalla presenza della sequenza TXY dove X è il glutammato, la prolina e glicina rispettivamente nelle ERK, JNK e p38 ^{71,72}.

Esse attivano un pathway di trasduzione del segnale (Fig. 4), che può regolare target localizzati nel nucleo o nel citoplasma ⁷³. Nel citoplasma fosforilano varie proteine associate alla membrana, proteine citoplasmatiche come altre chinasi, componenti del citoscheletro e svariati enzimi. Nei casi in cui il target di queste chinasi siano fattori di trascrizione (c-Jun, c-Fos, Elk1, c-Myc), esse agiscono all'interno del nucleo, ma solo una parte del pool di MAPKs attivo trasloca in questa sede, mentre la maggior parte è localizzata nel citoplasma o in altri compartimenti subcellulari.

Sono riportate in letteratura numerose evidenze sperimentali che coinvolgono le MAPKs nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare e che dimostrano una loro attività pro-oncogenica in alcune condizioni. Altri studi hanno dimostrato che le MAPKs, soprattutto le SAPKs, sono pro-apoptotiche e agiscono come oncosoppressori ⁷⁰. Infatti,

in genere l'attivazione di ERK favorisce la proliferazione cellulare, mentre l'attivazione di JNK e p38 è responsabile della morte cellulare ^{74, 75}.

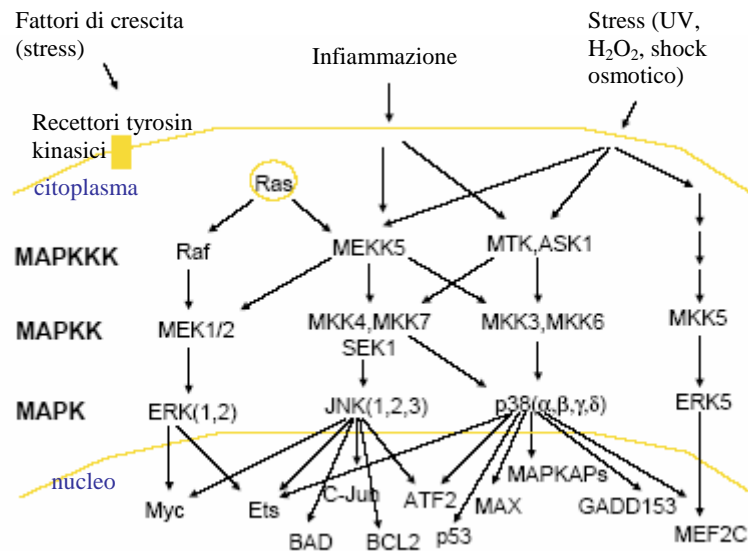


Figura 4. Schema della cascata di trasduzione del segnale mediata dalle MAP chinasi. Tale pathway prevede una cascata di eventi di fosforilazione alla quale partecipano varie chinasi: MKKK, MKK (o MEK), MAPK. Essa viene attivata in risposta a stimoli extracellulari, come fattori di crescita, citochine e vari tipi di stress cellulari. Una volta attivate, le MAPKs e le SAPKs fosforilano una notevole varietà di proteine, tra cui fattori di trascrizione o altre chinasi (MAPKAPs). Questi target controllano le risposte cellulari, intervenendo nella regolazione della crescita, nel differenziamento, nello sviluppo e nell'apoptosi ⁷⁰.

ERK1 ed ERK2 intervengono nella regolazione della meiosi, mitosi e delle funzioni post-mitotiche delle cellule differenziate. Molti stimoli sono in grado di attivare la pathway di ERK, come fattori di crescita, citochine, infezioni virali, ligandi per recettori accoppiati a proteine G e carcinogeni. In seguito alla loro attivazione, queste chinasi traslocano nel nucleo e, a seconda dello stimolo iniziale, fosforilano substrati diversi come attivatori della trascrizione (p90, RSK S6 kinase) e fattori di trascrizione (Elk-1, Ets1, Sap1a, m-Myc) ⁷⁶.

I membri della famiglia ERK sono coinvolti nella cascata oncogenica mediata da Ras e Raf. Mutazioni a carico di Ras o di Raf determinano un'attivazione costitutiva di ERK che stimola la transizione dalla fase G₀-G₁ alla fase S del ciclo cellulare e quindi alla divisione cellulare. L'iperattivazione di MEK1, il cui unico substrato noto è ERK, in cellule NiH3T3, risulta nella trasformazione neoplastica. L'analisi dell'espressione di ERK e della sua attività nei tumori ha supportato l'idea che le ERKs svolgano un ruolo chiave nel processo di carcinogenesi. Ad esempio, è stata dimostrata una correlazione

tra lo sviluppo del carcinoma della prostata e l'attività di ERK1/2, poiché tali cellule tumorali mostrano un drammatico incremento dei livelli di attività di queste chinasi (circa 15 volte). Una simile correlazione tra l'attività di ERK e lo stadio tumorale è stata osservata anche per altri tipi di tumori, come il cancro della mammella e del polmone ⁷⁰. La sottofamiglia JNK comprende JNK1 e JNK2, prodotti per splicing alternativo ed espressi in vari tessuti, e JNK3, specifico del cervello. Tali chinasi sono state inizialmente identificate come le principali responsabili della fosforilazione ed attivazione della onco-proteina c-Jun che è implicata nella trasformazione neoplastica indotta da certi oncogeni. A differenza di ERK e di p38, che fosforilano i loro substrati a livello nucleare e citoplasmatico, JNK è prevalentemente nucleare e agisce su vari fattori di trascrizione come ATF-2, Elk-1, Myc, Smad3 ⁷⁶. L'attivazione del pathway di JNK è stimolata da vari segnali di stress e generalmente determina apoptosi, anche se in certe condizioni promuove la sopravvivenza cellulare. E' inoltre coinvolta nella tumorigenesi e nell'infiammazione.

Sono stati riscontrati elevati livelli di c-Jun nel midollo osseo di pazienti con leucemia mieloide acuta e l'attività di JNK è elevata nei leucociti isolati da pazienti con leucemia T dell'adulto. JNK inoltre è attivato da Bcr-Abl e questa attivazione sembra essere importante per la trasformazione neoplastica. Altri studi suggeriscono che JNK promuova il fenomeno neoplastico mediante i suoi effetti su AP-1 o altri substrati, come Elk-1. Infine JNK può sostenere la sopravvivenza cellulare fosforilando ed inattivando la proteina pro-apoptotica BAD. Nonostante le consistenti evidenze di JNK come agente pro-oncogenico, paradossalmente spesso sembra agire come soppressore tumorale. Sono molte le osservazioni riportate in letteratura che descrivono il coinvolgimento di JNK nella morte per apoptosi di vari tipi cellulari. Il duplice e opposto ruolo di JNK nel promuovere e nel sopprimere la carcinogenesi sembra essere direttamente correlato con il duplice ruolo di AP-1. JNK3 è stato trovato mutato in 10 tumori cerebrali umani su 19 analizzati; inoltre MKK4, l'attivatore delle JNKs, è mutato in molti tumori umani come quello del pancreas, della mammella, del colon e della prostata, e questa mutazione determina una ridotta attivazione di JNK e correla con l'aggressività del tumore ⁷⁰.

Inizialmente descritta nel 1994 da Han et al. ^{77, 78}, la cascata mediata dalle MAP chinasi p38 regola non solo una notevole varietà di risposte cellulari allo stress ed all'infiammazione, ma interviene anche nella regolazione del ciclo cellulare, nella morte cellulare, nello sviluppo e nel differenziamento ⁷².

In seguito all'esposizione della cellula a vari stimoli come fattori solubili (TNF- α e IL-1), stress ambientali (shock termico, stress osmotico e ossidativo) e contatto cellula-cellula, viene attivata MEKK4 che attiva MKK3 ed MKK6, che a loro volta fosforilano p38 attivandola.

Esistono 4 isoforme di p38 α , β , γ , δ , che differiscono per l'espressione tissutale e per la diversa affinità ad attivatori e substrati. Le isoforme α e β sono espresse in molti tessuti mentre le γ e δ presentano un'espressione molto più limitata ⁷⁹.

Numerosi studi hanno dimostrato che le isoforme di p38 sono coinvolte nell'induzione del blocco del ciclo cellulare e nell'apoptosi, nella regolazione negativa della trasformazione neoplastica e nella carcinogenesi ⁸⁰.

L'osservazione che p38 agisca come un soppressore della crescita tumorale è supportata da studi che hanno dimostrato che l'inattivazione di Wip1, una fosfatasi di p38, determina l'inibizione della tumorigenicità di MEFs (mouse embryonic fibroblasts) indotta da *Ha-ras*. Inoltre, è stato dimostrato che l'iperattivazione di p38 inibisce la tumorigenicità *in vivo* e che l'inibizione dell'attività di questa chinasi mediante knock-out dei suoi attivatori MKK3 e MKK6 aumenta la tumorigenicità ⁷⁰.

Il rhabdomyosarcoma, un tumore solido del bambino, sembra essere in parte la conseguenza della ridotta attività di p38 che, se attivo, svolge un ruolo chiave nel differenziamento dei precursori delle cellule muscolari. Inoltre è stato dimostrato che le cellule di questa neoplasia vanno incontro ad un blocco della crescita cellulare in seguito ad attivazione di p38 ottenuta mediante espressione della forma attiva di MKK6. Recenti studi hanno dimostrato che p38 contribuisce all'inibizione di proteine che inducono il ciclo cellulare come la ciclina D1, Cdc25A e Cdc25B, e contribuisce all'attivazione di p53 ⁸⁰. Infatti questa chinasi è in grado di fosforilare p53 a vari livelli (Ser 20, 33, 37 e 46). Ad esempio in seguito a shock osmotico, p38 viene attivata e fosforila p53 a livello del residuo Ser 33, inducendo così il blocco della cellula in fase G₁ ⁸¹.

Nonostante le numerose evidenze che p38 agisca come soppressore tumorale, occorre ricordare che in alcuni casi p38 è implicato nella proliferazione cellulare e nello sviluppo dei tumori. Ad esempio p38 è un mediatore critico dell'attività oncogenica di TGF β nel cancro della prostata. In questo modello infatti, l'espressione di IL-6 indotta da TGF β è mediata dall'asse p38-NF κ B ⁷⁰.

Nell'ambito della dormienza tumorale, recenti pubblicazioni di Ossowski e Aguirre-Ghiso ⁸² indicano che p38 è in grado di indurre la dormienza tumorale mediante un meccanismo che richiede l'inibizione di geni promuoventi le metastasi come uPAR (urokinase receptor; Fig. 5).

L'importanza di uPAR nell'induzione della dormienza è stata studiata in un modello di carcinoma squamoso umano altamente tumorigenico (HEp3) che esprime elevati livelli di uPAR.

Tale recettore è fisicamente associato con il recettore della fibronectina (FN), l'integrina $\alpha_5\beta_1$. Questa interazione determina un aumento dell'attivazione/avidità dell'integrina, l'adesione a FN, la fibrillogenesi, e l'attivazione del pathway mitogenico Ras-ERK, promuovendo così la proliferazione cellulare *in vivo* ^{82, 83}.

Nelle cellule che presentano una ridotta espressione di uPAR, l'interazione tra uPAR e l'integrina $\alpha_5\beta_1$ è molto ridotta. Analisi più dettagliate hanno dimostrato che nelle cellule tumorigeniche HEp3, che presentano elevati livelli di ERK attivo, la down-regolazione di uPAR e la rottura del complesso uPAR-integrina $\alpha_5\beta_1$ determina una riduzione dell'attivazione del pathway di ERK che risulta in un arresto della cellula nella fase G_0/G_1 del ciclo cellulare, inducendo così la dormienza tumorale *in vivo*. La downregolazione di uPAR rende quindi le cellule HEp3 dormienti. Infatti, quando tali cellule vengono inoculate in CAM (chorioallantoic membrane) di embrioni di pollo e vengono mantenute per molti passaggi *in vivo*, entrano in un protratto periodo di dormienza. Mediante saggi di incorporazione di bromodeossiridina e saggi che permettono di valutare l'apoptosi, è stato inoltre possibile stabilire che la dormienza era il risultato di una ridotta proliferazione, piuttosto che di un aumento dell'apoptosi. È stato così possibile avanzare l'ipotesi secondo la quale l'asse uPA/uPAR svolge due funzioni complementari: da una parte attiva la cascata proteolitica che determina l'invasione locale e la formazione di metastasi, dall'altra agisce nella trasduzione del segnale che favorisce la proliferazione cellulare *in vivo*.

La trasduzione del segnale mediata dall'uPAR induce tumorigenicità non solo per iperattivazione del pathway di ERK, ma anche per l'inibizione del pathway di p38 che è necessario per il mantenimento del blocco in fase G_0/G_1 del ciclo cellulare ⁸²⁻⁸⁵.

Nelle cellule caratterizzate da elevati livelli di uPAR, il complesso uPAR-integrina $\alpha_5\beta_1$ promuove l'assemblaggio delle fibrille di fibronectina che, mediante l'inattivazione di Cdc42, sono in grado di mantenere il pathway di p38 in uno stato di ridotta attivazione. Quando il complesso uPAR-integrina viene meno, come nel caso dei tumori HEp3

dormienti, p38 è attivo e induce il blocco della crescita *in vivo*. La ri-espressione di uPAR o l'attivazione costitutiva di ERK in queste cellule è sufficiente per interrompere lo stato dormienza tumorale. Sulla base di questi risultati è possibile stabilire che i livelli di espressione di uPAR influenzano la decisione tra tumorigenicità e dormienza, regolando il rapporto tra i pathway di ERK e di p38.

In conclusione, quando l'attivazione uPAR-dipendente di ERK prevale sul signaling di p38 viene mantenuta la tumorigenicità, se invece prevale l'attivazione di p38, come nel caso della down-regolazione di uPAR, viene indotto uno stato di dormienza. Questo rapporto è predittivo del comportamento *in vivo* di vari tipi tumorali come il cancro della prostata, della mammella ed il fibrosarcoma, indicando che questo meccanismo non è limitato solo al modello HEp3.

p38 svolge dunque, un importante ruolo nell'induzione e nel mantenimento della dormienza tumorale. I meccanismi che p38 attiva per mantenere lo stato di dormienza sono tuttavia poco conosciuti. Studi di proteomica per i geni regolati da p38 nei tumori HEp-3 dormienti confrontati con quelli cresciuti, hanno dimostrato che p38 up-regola 4 chaperoni del reticolo endoplasmatico (RE), Bip, ER60, HSP47 e ciclofilina B^{82, 86}. L'espressione di queste proteine è normalmente indotta durante l'adattamento allo stress causato dall'"unfolding" delle proteine nel RE, una risposta definita UPR (unfolded protein response).

Nei tumori HEp3 dormienti, l'up-regolazione p38-dipendente di Bip correla con l'attivazione costitutiva di PERK (protein kinase-like ER kinase) e la fosforilazione di eIF2 α . L'attivazione di PERK nelle risposte allo stress del RE induce l'arresto in G₀/G₁ e la sopravvivenza cellulare, le due componenti della dormienza. L'attivazione di PERK mediante p38 e l'up-regolazione di Bip, che inibisce Bax, rendono le cellule dormienti HEp3 resistenti all'apoptosi indotta da vari agenti che inducono stress del RE. Inoltre la fosforilazione di eIF2 α mediata da PERK, ma non l'espressione di Bip, è implicata nell'arresto della crescita e nella dormienza *in vivo* poiché vi è una ridotta espressione della ciclina D₁.

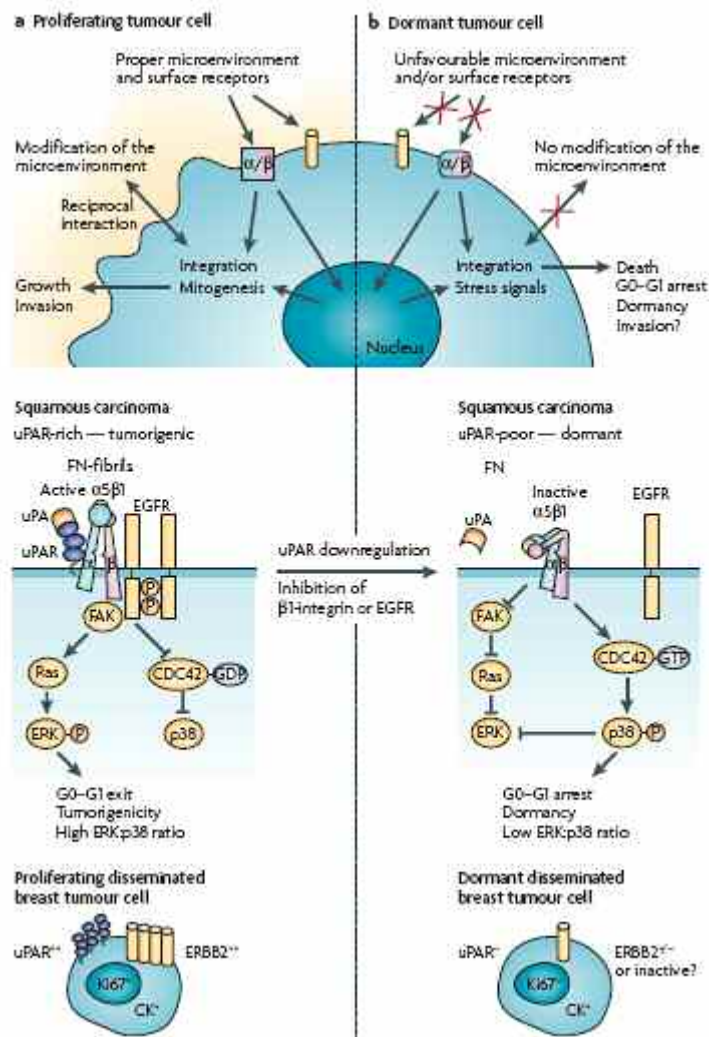


Figura 5. Schema del coinvolgimento delle MAP chinasi nel modello di dormienza descritto da Aguirre-Ghiso et al. ⁶⁸.

1.4 MKP-1 (Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1)

Come detto, lo stato di attivazione delle MAP chinasi è critico e deve essere finemente regolato, al fine di controllare la proliferazione cellulare, lo sviluppo, l'apoptosi, il differenziamento e l'infiammazione. L'attivazione delle MAP chinasi in risposta a vari stimoli, è un processo reversibile e le fosfatasi svolgono quindi un ruolo importante nel controllare l'attività di queste proteine.

Le MKPs (mitogen-activated protein kinase phosphatase), sono una famiglia di protein fosfatasi che inattivano le MAPKs defosforilandole. Sono stati identificati 11 tipi di MKPs, che possono essere classificati in 3 principali categorie, sulla base della loro preferenza nel defosforilare residui di tirosina, serina/treonina o tirosina e treonina. In

questo ultimo caso le fosfatasi sono dette DS (Dual Specific), per la loro duplice specificità, poiché defosforilano i residui di treonina e tirosina della sequenza pTXpY, localizzata nel loop di attivazione delle MAPKs. Le DS, a loro volta, possono essere suddivise in quattro classi sulla base delle caratteristiche strutturali e funzionali ^{87,88}.

MKP-1, anche detta DUSP1 (dual specificity phosphatase-1) o CL100, identificata nel 1991 come un gene indotto da fattori di crescita ed implicato nella transizione G₀/G₁ del ciclo cellulare, appartiene al II tipo di DS-MKP, ed è codificata da un "immediate-early gene" (IEG). Strutturalmente, è costituita da due domini CH2, definiti CH2A e CH2B e da un dominio PTP. I domini CH2 sono localizzati all'N-terminale, la regione più variabile tra le MKPs; il dominio PTP, comune a tutte le MKPs, è localizzato al C-terminale ⁸⁹.

MKP-1 viene indotta da una notevole varietà di stimoli, gli stessi che attivano la cascata delle MAPKs, come radiazioni UV, fattori di crescita e stress ossidativo. L'esposizione della cellula a questi stimoli induce l'espressione di MKP-1 che defosforila le MAPKs inattivandole.

MKP-1 possiede una specificità di substrato nell'inattivare le MAPKs; nonostante studi iniziali indicassero che ERK fosse il principale substrato di MKP-1, studi di overespressione hanno stabilito che questa fosfatasi presenta una maggiore affinità per p38/JNK ed infine per ERK.

E' importante sottolineare che la specificità di substrato può essere dipendente dal tipo cellulare e dallo stimolo.

MKP-1 è localizzata a livello nucleare, ma non possiede una classica sequenza di localizzazione nucleare (NLS). La regione N-terminale sembra essere importante per l'indirizzare questa fosfatasi nel nucleo, in particolare il motivo LXXLL che precede il dominio CH2A. Tale motivo infatti, media interazioni proteina-proteina con i recettori ormonali nucleari, ma anche con co-attivatori, co-repressori e chaperoni. Inoltre, il cluster di amminoacidi basici localizzato tra i domini CH2A e CH2B, sembra svolgere un ruolo importante nel mantenere MKP-1 nel nucleo.

Quale è però l'importanza di MKP-1 nel nucleo? MKP-1 è indotta da vari stimoli e interviene nel regolare l'espressione genica attivata dalle MAPKs. Ad esempio, la risposta SRE (Serum Response Element), è regolata principalmente da p38 ed ERK, che fosforilano Elk-1, un fattore di trascrizione, che in questa forma attivata interagisce con SRF (Serum Response Factor), e modula l'espressione di vari geni. Infatti, molti "immediate-early genes" come *c-fos*, contengono nel promotore l'elemento SRE, che

formando un complesso con SRF e Elk-1 attiva la trascrizione. MKP-1 una volta prodotto nel citoplasma, trasloca nel nucleo, dove agisce in due modi. In primo luogo compete con Elk-1 nel legare le MAPKs prevenendone la fosforilazione e dunque l'attivazione; ed inoltre MKP-1 defosforila il pool subcellulare delle MAPKs mediante il dominio PTP, determinandone l'inattivazione^{90,91}.

L'espressione e l'attività di questa proteina sono finemente regolate. Tale regolazione si manifesta a molti livelli tra cui: trascrizione, stabilità dell'mRNA, elongazione dell'mRNA, stabilità della proteina, affinità per il substrato e localizzazione cellulare⁹¹.

Tra questi, importanti studi sono stati effettuati sulla stabilità della proteina. L'emivita di MKP-1 varia tra 40 minuti⁹² e 2 ore⁹³ e questo è dovuto alla varietà di meccanismi in grado di regolare la degradazione di questa fosfatasi. È importante sottolineare come le stesse MAP chinasi la cui attività è regolata da MKP-1 possano influenzare più o meno direttamente i livelli di MKP-1. È infatti noto che ERK1/2 sono in grado di fosforilare MKP-1 su diversi residui di serina influenzandone in senso positivo o negativo la stabilità, a seconda del residuo interessato^{94,95}. La degradazione di MKP-1 è in questo caso, mediata dall'intervento dell'ubiquitina ligasi Skp2⁹⁶. Anche p38 è in grado di incrementare i livelli proteici di MKP-1 riducendone la degradazione ma in questo caso il meccanismo non è ancora ben noto⁷⁵. Altri sono i casi in cui la stabilità di questa proteina risulta aumentata, tra questi ricordiamo lo stress termico⁹⁷ ed il trattamento con glucocorticoidi⁹⁸.

Nonostante MKP-1 sia in grado di controllare l'attività di proteine importanti come le MAP chinasi e sia espressa in modo ubiquitario nell'organismo, topi KO per questa fosfatasi si sviluppano normalmente, sono fertili e non dimostrano alcuna alterazione istologica o funzionale a carico di nessun organo o tessuto⁹⁹. Le uniche alterazioni che si manifestano sono legate alla risposta ad alcuni stimoli esterni e riguardano soprattutto il sistema immunitario. Questi topi infatti risultano essere estremamente sensibili all'LPS, in quanto sviluppano una risposta abnorme, caratterizzata dal rilascio di elevate quantità di citochine, che porta al danneggiamento di diversi organi, tra cui fegato, reni e polmoni ed in sole 48 ore alla morte dell'animale^{99,100}. Un'altra anomalia legata all'attività del sistema immunitario è data dal fatto che questi topi sviluppano con maggiore incidenza e severità artrite reumatoide in seguito a stimolo con collagene II⁹⁹.

1.4.1 MKP-1 e cancro

Subito dopo la caratterizzazione di MKP-1, l'espressione di questa fosfatasi è stata oggetto di studio anche in ambito oncologico. Queste ricerche iniziali hanno evidenziato un significativo aumento dell'espressione di questa proteina in una serie di neoplasie epiteliali umane tra cui il cancro della vescica, del colon e della prostata. Curiosamente, questa elevata espressione è stata riscontrata solo nelle fasi precoci della malattia, e va progressivamente riducendosi nei tumori di grado superiore e nelle metastasi^{101, 102}. Nessuna alterazione cromosomica a carico della regione *5q34-ter* contenente il gene, né mutazioni del dominio catalitico di MKP-1 sono state descritte^{101, 103}. I meccanismi che alterano l'espressione di MKP-1 nelle neoplasie possono essere vari e complessi. I livelli di questa proteina sono regolati per esempio da p53 e da una serie di stimoli come lo stress ossidativo, il danno al DNA e l'ipossia, suggerendo che MKP-1 possa giocare un ruolo nella regolazione delle MAP chinasi da parte del microambiente¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Nel caso del tumore della prostata umano, gli aumentati livelli di espressione di questa fosfatasi correlano con una ridotta attivazione di JNK e ridotti livelli di apoptosi^{107, 108}. Questi dati suggeriscono che MKP-1 possa avere un ruolo anti-apoptotico in questa neoplasia. Tale idea è sostenuta anche dalla scoperta che questa fosfatasi è in grado di proteggere cellule tumorali prostatiche dallo stimolo pro-apoptotico indotto dal ligando di Fas¹⁰⁹. MKP-1 è stata trovata da moderatamente a fortemente espressa anche nel 57,6% dei carcinomi ovarici invasivi e la sua espressione si è dimostrata essere un marker prognostico indicante una minore sopravvivenza libera da progressione di malattia¹¹⁰. Nel carcinoma della mammella è stata rilevata una consistente espressione anche nelle forme scarsamente differenziate e nelle fasi tardive della malattia. Anche in questo caso i livelli di MKP-1 correlano in modo inverso con l'attivazione di JNK. A conferma di questa evidenza, è stato dimostrato che questa fosfatasi è in grado di ridurre l'attivazione di JNK in risposta ad alcuni farmaci (mecloroetamina, doxorubicina e paclitaxel), con conseguente riduzione nell'attivazione delle caspasi, ridotta frammentazione del DNA e aumentata sopravvivenza cellulare^{101, 111, 112}. Che questa proteina possa giocare un ruolo protettivo nella risposta cellulare a diversi stimoli pro-apoptotici come lo stress ossidativo, le radiazioni UV^{74, 113} ed alcuni chemioterapici, è ormai un dato confermato da numerosi studi. Tra questi farmaci ricordiamo gli inibitori del proteasoma nel trattamento del tumore del polmone non a piccole cellule¹¹⁴, l'etoposide nel trattamento del glioma¹¹⁵ e soprattutto il cisplatino, nei confronti del quale MKP-1 sembra avere un

ruolo protettivo in un ampio numero di neoplasie tra cui l'osteosarcoma, il carcinoma ovarico e del polmone ¹¹⁶⁻¹¹⁹.

1.5 Un modello di dormienza tumorale

Nel nostro laboratorio è stato sviluppato e studiato un modello di dormienza tumorale basato su cellule di T-ALL. Nel nostro "setting" sperimentale, quando le cellule di leucemia T MOLT-3 vengono inoculate sotto cute (s.c.) in topi immunodeficienti NOD/SCID non sono tumorigeniche e solo nel 20% dei casi sono in grado di generare piccole masse avascolari dormienti. Tale comportamento *in vivo* è causato dal ridotto potenziale angiogenico che queste cellule possiedono. Se però si induce la formazione di nuovi vasi attraverso un transitorio stimolo angiogenico iniziale (inoculando assieme alle cellule dei fattori angiogenici) oppure rendendo stabilmente angiogeniche le cellule, la linea MOLT-3 è in grado di generare tumori che crescono. Una importante differenza tra la condizione di crescita e quella di dormienza è che la seconda è caratterizzata da elevati livelli di apoptosi rispetto alla prima (Fig. 6) ¹²⁰.

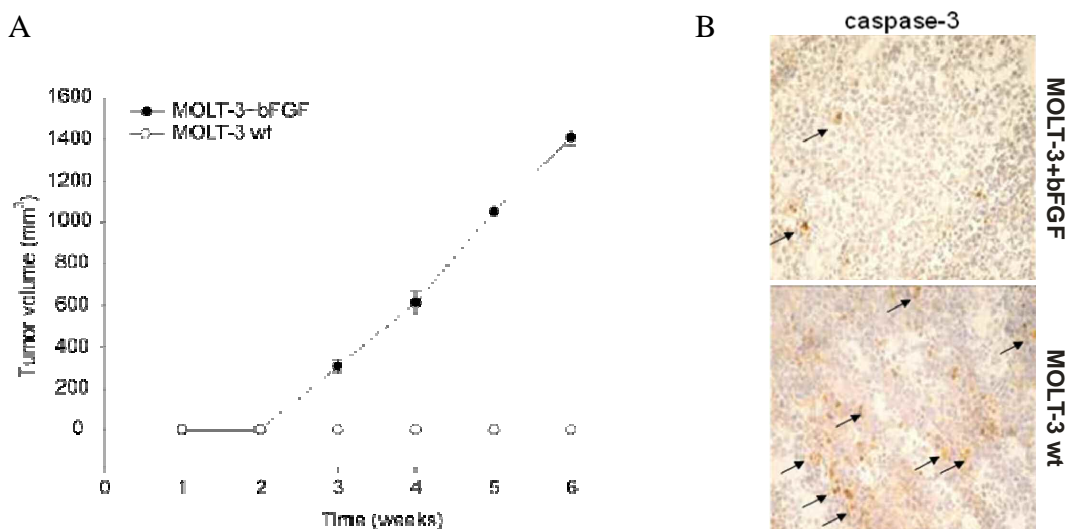


Figura 6. A) Curve di crescita delle cellule MOLT-3 inoculate con o senza il fattore angiogenico bFGF. B) I tumori dormienti (MOLT-3) sono caratterizzati da elevati livelli di apoptosi rispetto ai tumori che crescono (MOLT-3+bFGF) ¹²⁰.

Le nostre ricerche hanno poi messo in evidenza come, nel nostro modello, il processo angiogenico non giochi un ruolo importante esclusivamente nel rifornire di ossigeno e nutrienti la massa neoplastica. Abbiamo infatti dimostrato che le cellule endoteliali,

ancora prima di dare origine a vasi sanguigni formati e funzionali, sono in grado di trasmettere un segnale alle cellule tumorali attraverso un'interazione cellula-cellula. Nello specifico, attraverso l'interazione tra il ligando Dll4 espresso per la maggior parte dalle cellule endoteliali ed il recettore Notch3 espresso dalle cellule neoplastiche. L'inibizione quindi di questa interazione è in grado di ridurre notevolmente la crescita delle cellule MOLT-3 *in vivo* anche in presenza di uno stimolo angiogenico esterno (Fig. 7).

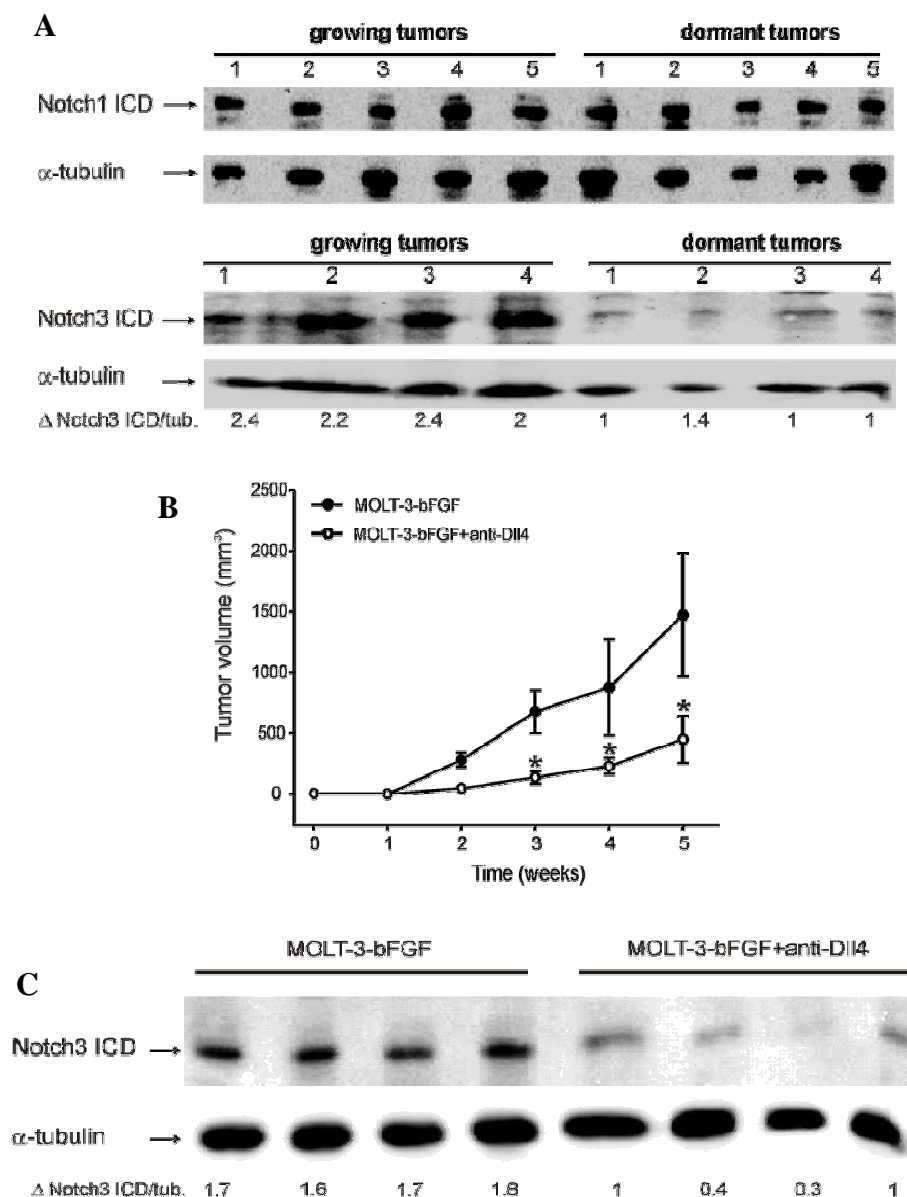


Figura 7. A) I tumori che crescono presentano una maggiore attivazione di Notch3 ma non di Notch1, rispetto ai tumori dormienti. B) Curve di crescita di tumori trattati o non con un anticorpo neutralizzante Dll4. C) Questo trattamento oltre a rallentare notevolmente la crescita neoplastica induce anche una importante riduzione nell'attivazione di Notch3 nelle cellule tumorali {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}.

L'attivazione di Notch3 da parte di Dll4 è in grado di proteggere le cellule di leucemia dall'apoptosi indotta da deprivazione di siero, come dimostrato *in vitro* tramite saggio di co-cultura tra cellule endoteliali murine che esprimono questo ligando e cellule di T-ALL (Fig. 8).

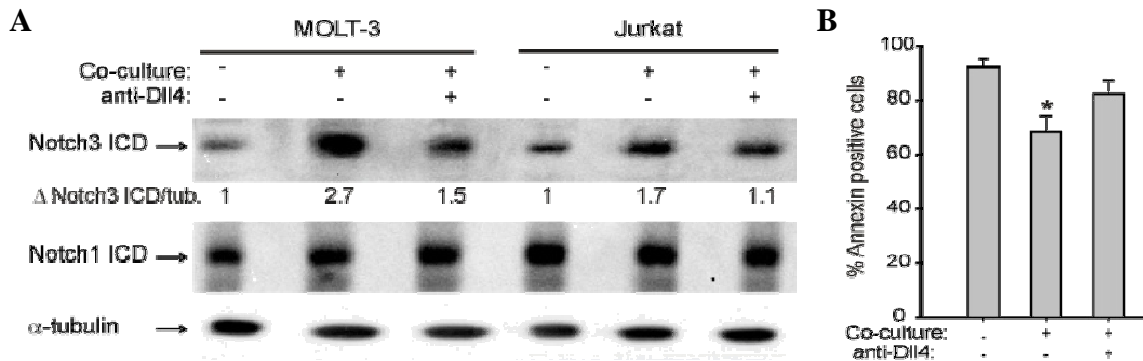


Figura 8. **A**) La co-cultura con cellule endoteliali è in grado di attivare Notch3 in cellule di T-ALL tramite Dll4. **B**) Questa stessa interazione riduce gli effetti pro-apoptotici indotti dalla deprivazione di siero in cellule di leucemia {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}.

Inoltre, lo stato di attivazione di Notch3 sembra essere un fattore importante nel determinare il mantenimento o l'uscita dallo stato di dormienza di queste cellule in quanto l'aumento forzato dei livelli del Notch3-ICD è in grado di promuovere la crescita delle cellule MOLT-3 in modo indipendente da stimoli angiogenici mentre il silenziamento di questo recettore determina il blocco della crescita di una variante tumorigenica di queste cellule (Fig. 9) {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}.

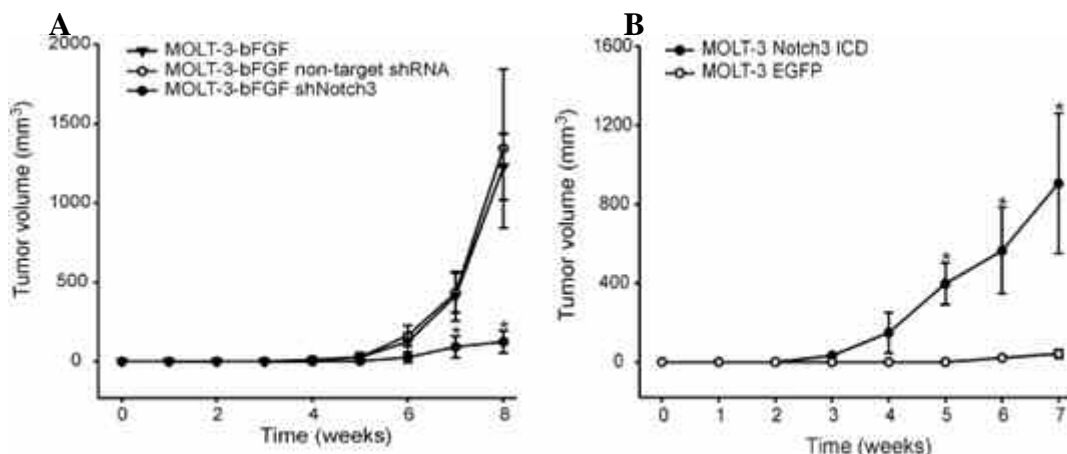


Figura 9. Curve di crescita di cellule MOLT-3 in cui sono stati manipolati i livelli di Notch3-ICD. **A**) Il silenziamento di Notch3 riduce drasticamente le capacità di crescita di una variante tumorigenica di MOLT-3. **B**) L'aumento dei livelli di Notch3-ICD è in grado di indurre crescita tumorale evitando il fenomeno della dormienza {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}.

2. SCOPO DELLA TESI

Il signalling del Notch è da qualche tempo al centro dell'attenzione di molti studi sulle T-ALL. Nel nostro laboratorio è stato inoltre sviluppato un modello di dormienza tumorale basato su questo tipo di leucemia in cui questa pathway sembra giocare un ruolo importante. Nel presente studio si è cercato di investigare alcuni dei meccanismi molecolari innescati dall'attivazione di Notch3 che sono poi responsabili dell'uscita dalla dormienza tumorale di queste cellule. Una volta identificati, si è proceduto all'analisi di quelle che sono le conseguenze funzionali della loro attivazione soprattutto a livello di apoptosi. Nella parte conclusiva di questo lavoro inoltre, si è cercato di estendere le evidenze ottenute in questo modello anche alla normale biologia delle T-ALL ed in parte alle possibili implicazioni terapeutiche di queste.

3. MATERIALI E METODI

3.1 LINEE CELLULARI E TRATTAMENTI

3.1.1 *Colture cellulari*

In questo lavoro sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

- le linee T-ALL MOLT-3, Jurkat, Loucy, CCRF-HSB-2, CEM ed SKW3 sono state acquistate dalla ATCC (American Tissue Culture Collection) mentre le ALL-SIL, KOPK-1, P12 ICHIKAWA, TALL-1, DND4.1, CUTLL-1, HPB-ALL sono state ottenute dal Dr. A. Ferrando (Institute for Cancer Genetics-Columbia University, Columbia University Medical Center, New York, USA). Tutte sono state mantenute in RPMI 1640 (EuroClone, Leeds, West Yorkshire UK), supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), l'1% di L-glutamina, l'1% di HEPES (Cambrex, Walkersville, USA).
- la linea 293T è stata ottenuta dalla ATCC ed è stata utilizzata come linea *packaging* per la produzione delle particelle virali. E' stata coltivata in terreno DMEM (Sigma, St.Louis, MO) contenente il 10% di FBS.
- le cellule murine endoteliali microvascolari (SIEC) sono state ottenute dalla Dr.ssa A. Vecchi (Istituto Mario Negri, Milano, Italia) e sono state mantenute in DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino 20% (FCS), 1 mM L-glutamina, 1% di aminoacidi non essenziali, 1 mM Na piruvato, supplemento per la crescita delle cellule endoteliali (Sigma-Aldrich) ed eparina (100 µg/ml).

3.1.2 *Cellule primarie umane*

Sono inoltre stati analizzati campioni di T-ALL primaria umana dell'adulto ottenuti dal Prof. GC. Semenzato.

3.1.3 Trattamenti *in vitro* delle cellule

In questo lavoro le cellule sono state sottoposte a diversi trattamenti *in vitro*:

- al fine di inibire l'attivazione dei recettori Notch, le cellule sono state trattate con degli inibitori delle γ -secretasi: Compound E (10 μ M per 72-96 ore; Calbiochem) e GSI (20 e 40 μ M per 72 ore; Sigma-Aldrich). Brevemente, le cellule vengono piastrate alla concentrazione di $2,5-5 \times 10^5$ cellule/ml in terreno completo a cui viene aggiunto l'inibitore oppure, come controllo negativo, un uguale volume di dimetilsolfossido (DMSO; Sigma-Aldrich). Le cellule sono quindi raccolte dopo 72-96 ore ed analizzate;
- al fine di attivare naturalmente il signalling di Notch, le cellule sono state coltivate in piastre P6 precedentemente ricoperte con la proteina ricombinante Dll4 murina (rmDll4; R&D, Minneapolis, MN). Brevemente, i pozzetti vengono preparati ricoprendoli con il rmDll4 o con la BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma-Aldrich) diluiti in PBS (Phosphate Buffered Saline; Sigma-Aldrich) alla concentrazione finale di 4 μ g/ml e lasciandole così per circa 15 ore a 4°C. Terminata questa incubazione, i pozzetti sono svuotati e lavati con PBS e le cellule vengono piastrate alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml in terreno completo. Dopo 48 ore si raccolgono le cellule per l'analisi;
- in alcuni esperimenti 1×10^5 cellule della linea SIEC vengono piastrate in piastre P6 e trattate con bFGF (100 ng/ml) e VEGF (10 ng/ml), dopo 48 ore di incubazione queste vengono lavate e si procede a co-cultivare le cellule MOLT-3 ($0,75-1 \times 10^6$ cellule) per 48h in RPMI completo con le SIEC in presenza o meno di un anticorpo neutralizzante Dll4 (2,7 μ g/ml; ricevuto dal Dr. M. Yan, Genentech, San Francisco, USA). Come controllo negativo la stessa quantità di MOLT-3 sono messe in pozzetto di P6 in assenza delle cellule SIEC. Dopo 48 ore si raccolgono solo le cellule MOLT-3 per l'analisi;
- diversi stimoli pro-apoptotici sono stati utilizzati in questo lavoro (in ogni caso le cellule sono piastrate alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml):
 - 1) totale deprivazione di siero per 48-72 ore

- 2) anisomicina (2,5 μ M per 6 ore; Sigma-Aldrich)
- 3) chemioterapici (20 ore): cisplatino (6 μ g/ml), mitoxantrone (0,1 μ g/ml), doxorubicina (0,3 μ g/ml), etoposide (0,1 μ g/ml), topotecano (10 ng/ml) e vincristina (10 μ g/ml). (Sigma-Aldrich).

3.2 STUDI NELL'ANIMALE

3.2.1 Manipolazione degli animali

Tutti gli esperimenti *in vivo* sono stati effettuati in topi immunodeficienti NOD/SCID (Charles River, Wilmington, MA, USA).

Per ottenere i tumori dormienti sono state inoculate 3×10^6 cellule MOLT-3 sotto cute (s.c.) in presenza di MATRIGEL (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA) su entrambi i fianchi di topi femmine mentre per ottenere tumori che crescono si è inoculato assieme alle cellule ed al MATRIGEL anche un mix di fattori angiogenici (VEGF 100 ng/ml e bFGF 100 ng/ml; Peprotech, London, UK).

In generale, nella maggior parte dei successivi esperimenti, varianti delle cellule MOLT3 (3×10^6 cellule) sono sempre state inoculate s.c. in presenza o meno di MATRIGEL e fattori angiogenici a seconda delle esigenze sperimentali (vedi dettagli nei RISULTATI).

In una sola serie di esperimenti gli animali inoculati con cellule e fattori angiogenici venivano anche trattati con un anticorpo anti-Dll4 ogni 3 giorni alla dose di 10 μ g per grammo dell'animale.

Gli animali venivano costantemente monitorati per il loro stato di salute e per le dimensioni dei tumori (il volume tumorale in mm^3 viene calcolato secondo la formula: $L \times l^2 \times 0,5$ dove L è il diametro maggiore ed l il minore e 0,5 è una costante per calcolare il volume di un ellissoide).

Il sacrificio veniva effettuato a diversi intervalli di tempo dall'inoculo a seconda delle necessità sperimentali.

Le procedure concernenti gli animali ed il loro trattamento adottate in questo studio sono conformi alle leggi ed alle linee guida nazionali ed internazionali in materia (EEC Council directive 86/609, OJ L 358, 12 Dicembre 1987).

3.2.2 "In vivo imaging" dei tumori

Negli esperimenti inerenti gli effetti della manipolazione dei livelli di MKP-1 sulla dormienza tumorale sono state utilizzate cellule MOLT-3 manipolate geneticamente in modo che esprimano il gene della luciferasi al fine di poter seguirne la crescita in modo più accurato soprattutto nelle fasi iniziali.

L'analisi è stata fatta settimanalmente. Brevemente, i topi vengono anestetizzati e 10 minuti prima dell'operazione di *imaging* ricevono per via intraperitoneale 200 µl di soluzione di luciferina (Biosynth) ad una concentrazione di 15 mg/ml in PBS. La luciferina viene convertita in un metabolita luminescente dall'enzima luciferasi e la luce emessa viene rilevata con apposite strumentazioni non invasive. L'imaging in vivo è stato eseguito tramite l'*Imaging System* IVIS Lumina, composto da una videocamera CCD raffreddata, montata su una cameretta oscura, un sistema di controllo della videocamera, un sistema di raffreddamento ed un computer con sistema operativo Windows. Il tempo di acquisizione utilizzato è stato di 45 secondi e l'intensità del segnale è stata quantificata come la somma dei fotoni rilevati al secondo (p/s) all'interno della regione di interesse (ROI) disegnata attorno alla massa tumorale.

3.2.3 Estrazione e processamento delle masse *ex vivo*

Le masse tumorali sono state estratte *ex vivo*, dopo sacrificio dell'animale, a diversi intervalli di tempo dall'inoculo a seconda delle esigenze sperimentali. In alcuni casi i tumori sono stati processati meccanicamente per recuperare le cellule, al fine di analizzarle o mantenerle in coltura (es. ottenere la linea TC). Altre volte le masse tumorali sono state congelate in azoto liquido per essere in seguito omogenizzate in PBS al fine di poter estrarre l'RNA o analizzare le proteine mediante Western Blot. In alcuni casi l'espressione proteica è stata anche valutata tramite immunofluorescenza su sezioni tumorali.

3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA

3.3.1 *Western Blot (W.B.)*

Preparazione dei campioni, corsa elettroforetica e trasferimento

Al fine di preservare lo stato fosforilato di alcune proteine come fosfo-ERK e fosfo-p38, i campioni sono lavati con PSB freddo e centrifugati a 1700 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet viene poi risospeso in buffer di lisi per fosfoproteine (Buffer 5x: NP-40 1%; NaCl 150mM; TrisHCl pH7.5 50mM; EDTA 2 mM, H₂O; NaF; Na₃VO₄; inibitore proteasi), incubato per 15 minuti in ghiaccio e centrifugato a 4°C alla velocità di 15000 rpm per 10 minuti. Infine il surnatante viene recuperato, tra i 40 e gli 80 µg di proteine (kit di quantificazione Pierce, Rockford, USA) vengono diluite 1:2 con SDS 2x gel-loading buffer (100 mM tris-HCl pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% blu di bromofenolo e 20% glicerolo) e fatto bollire per 5 minuti. I campioni così preparati sono quindi pronti per essere caricati in gel di poliacrilamide la cui concentrazione è del 7,5-10%. Una volta caricato il gel, si effettua una corsa elettroforetica a 60 Volt per tutta la notte. La mattina successiva si esegue il trasferimento delle proteine così separate su una membrana di nitrocellulosa (Amersham Pharmacia) mediante trasferimento per 2 ore a 400 mA.

Ibridazione ed analisi finale

Il filtro viene messo a saturare per 2 ore in agitazione in PBS-0,1% Tween₂₀-5% latte (Sigma-Aldrich). Vengono poi effettuati due rapidi lavaggi con PBS-0,1% Tween₂₀ e si mette il filtro in incubazione per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario. Alternativamente, questa incubazione può essere effettuata per 1 ora a temperatura ambiente.

Sono stati utilizzati diversi anticorpi:

- anticorpo monoclonale anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr182; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) prodotto in topo e diluito 1:2000 in PBS-0,1% Tween₂₀-5% latte;
- anticorpo policlonale anti-p38 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) prodotto in coniglio e diluito 1:1000 in PBS-0,1% Tween₂₀-3% BSA;

- anticorpo policlonale anti-p44/42 (ERK1/2; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) prodotto in coniglio e diluito 1:1000 in PBS-0,1% Tween₂₀-3% BSA;
- anticorpo monoclonale anti-fosfo-p44/42 (Thr202/tyr204; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) prodotto in topo e diluito 1:2000 in PBS-0,1% Tween₂₀-5% latte;
- anticorpo policlonale anti-MKP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) prodotto in coniglio e diluito 1:500 in PBS-0.1% Tween₂₀-3% BSA;
- anticorpo policlonale anti-Notch3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) prodotto in coniglio e diluito 1:500 in PBS-0.1% Tween₂₀-3% BSA;
- anticorpo monoclonale anti-Notch1 (Cell Signalling Technologies, Beverly, MA) prodotto in coniglio e diluito 1:500 in PBS-0.1% Tween₂₀-5% BSA;
- anticorpo policlonale anti-Dll4 (Rockland, Gilbertsville, PA) prodotto in coniglio e diluito 1:500 in PBS-0.1% Tween₂₀-3% BSA;
- anticorpo anti-ubiquitina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) prodotto in topo e diluito 1:500 in PBS-0.1% Tween₂₀-3% BSA;
- anticorpo policlonale anti-PARP (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) prodotto in coniglio e diluito 1:1000 in PBS-0,1% Tween₂₀-5% latte;
- anticorpo monoclonale anti- α -tubulina (Sigma) prodotto in topo e diluito 1:3000 PBS-0,1% Tween₂₀-3% BSA.

Si effettuano poi tre lavaggi di 15 minuti in PBS-0,1% Tween₂₀. A questo punto si mette il filtro di nitrocellulosa in incubazione con l'anticorpo secondario anti-topo coniugato all'HRP (Horse Radish Peroxidase; Amersham Biosciences) o l'anticorpo secondario anti-coniglio coniugato all'HRP (Horse Radish Peroxidase; Amersham Biosciences), a seconda dell'anticorpo primario usato, entrambi gli anticorpi secondari sono diluiti 1:5000 in PBS-0,1% Tween₂₀-1% latte. Seguono quindi altri tre lavaggi di 15 minuti con PBS-0,1% Tween₂₀. Le proteine vengono quindi visualizzate mediante reazione di chemiluminescenza utilizzando i reagenti SuperSignal kit (Pierce, Rockford, IL) ed il sistema d'acquisizione d'immagini ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

3.3.2 Analisi dell'ubiquitinazione su immunoprecipitato anti-MKP-1

I campioni per l'analisi dell'ubiquitinazione su immunoprecipitato sono ottenuti lisando le cellule con lo stesso tampone di lisi utilizzato per le normali analisi di Western Blot. Circa 500 µg di proteine sono incubate per un'ora a temperatura ambiente in rotazione assieme a 4 µg di anticorpo anti-MKP-1. In seguito vengono aggiunti ai campioni 40 µl di proteina A/G Plus (Santa Cruz) in un volume finale di 1 ml. Il mix è lasciato in rotazione per una notte a 4°C. Gli immunoprecipitati vengono quindi lavati per tre volte in buffer di lisi. I campioni vengono quindi diluiti 1:2 con SDS 2x gel-loading buffer, bolliti e centrifugati. Il surnatante è quindi pronto per essere caricato in gel. Segue normale procedura di W.B.

3.3.3 Analisi al microscopio confocale

Cellule depositate su un vetrino poli-lisinato (10 µg/ml, Sigma-Aldrich), vengono fissate in PBS contenente formaldeide 4% e trattate con Image-IT FX Signal Enhancer (Molecular Probes) per ridurre il rumore di fondo. I campioni vengono poi marcati con l'anticorpo anti-MKP-1 (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:100 in PBS-0.1% Triton (Sigma-Aldrich) per 1 ora a temperatura ambiente. In seguito a 3 lavaggi di 5 minuti in PBS-0.1% Triton si procede alla rilevazione dell'anticorpo primario utilizzando un anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con il fluoroforo Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) per 1 ora a temperatura ambiente al buio. Per colorare i nuclei è stato utilizzato lo ioduro di propidio diluito 1:5000 in PBS (concentrazione iniziale 500 gr/ml) per 30 minuti a temperatura ambiente al buio prima di effettuare l'analisi al microscopio confocale. La scansione è stata effettuata con un microscopio confocale Zeiss LSM 510 corredato di tre sorgenti laser, Argon 488 nm, Helio-Neon 543 nm ed Helio-Neon 633 nm, rispettivamente. Le immagini delle cellule sono state prese in una sezione ottica di 3 micron con un obiettivo 40x ed uno zoom 3. Tutti i parametri sono stati standardizzati ed applicati a tutte le scansioni, per poter comparare i segnali ottenuti nei diversi campioni.

3.4 ANALISI CITOFLUORIMETRICHE

3.4.1 Marcatura di superficie

La marcatura di superficie permette di visualizzare gli antigeni esposti sulla superficie cellulare mediante il loro legame con anticorpi marcati con fluorocromi.

Per poter valutare l'apoptosi (vedi in seguito) delle cellule MOLT-3 *ex vivo*, è stato necessario poter distinguere queste dalle cellule murine presenti nelle masse tumorali. A tale scopo è stato utilizzato un anticorpo anti-CD5 (Coulter Beckman) coniugato con ficoeritrina (PE). Il CD5 è un antigene espresso ad alti livelli dalle cellule MOLT-3 che non riconosce le cellule murine. Dopo il recupero dei pellet di MATRIGEL in cui sono presenti le cellule tumorali, si procede alla dissezione meccanica di questi ed al recupero della componente cellulare. Si eseguono due lavaggio con PBS centrifugando a 1200 rpm per 6 minuti. Successivamente si elimina il surnatante, si risospende il pellet con PBS-3% BSA e si marcano le sospensioni cellulari con l'anticorpo anti-CD5 alla concentrazione di $1 \mu\text{g}/10^6$ cellule. Le cellule vengono dunque incubate per 20 minuti in ghiaccio. Dopo l'incubazione le cellule marcate vengono lavate con PBS e si centrifuga a 1200 rpm per 6 minuti. Il surnatante viene eliminato e le cellule così marcate sono pronte per la lettura al citofluorimetro oppure per ulteriori marcature (vedi valutazione dell'apoptosi in seguito).

Per ogni singola lettura sono stati acquisiti almeno 20000 eventi mediante citofluorimetro EPICS XL dotato di laser a ioni argon 488 (Coulter, Hialeah, FL) e analizzati con il software EXP032 (Coulter).

3.4.2 Valutazione dell'apoptosi mediante marcatura con Annessina V/Ioduro di Propidio

Per la quantificazione dell'apoptosi è stato utilizzato il kit Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany).

Durante l'apoptosi la cellula subisce la traslocazione del fosfolipide di membrana Fosfatidil-Serina (PS) dal lato interno della membrana, dove normalmente è localizzato, a quello esterno.

L'Annessina V è una proteina che si lega in modo Ca^{2+} -dipendente con elevata affinità e specificità alla Fosfatidil-Serina. E' possibile quindi utilizzare l'Annessina V marcata con un fluoroforo (nel nostro caso FITC) come sonda sensibile per rilevare l'esposizione della Fosfatidil-Serina sulla superficie cellulare ed individuare la frazione di cellule in apoptosi all'interno della popolazione totale.

Anche nelle cellule in necrosi la Fosfatidil-Serina è accessibile alla marcatura a causa della perdita di integrità della membrana plasmatica; tuttavia la colorazione con lo Ioduro di Propidio (P.I.) permette di distinguere le cellule necrotiche da quelle

apoptotiche; infatti il P.I. è un colorante che si lega al DNA e che è in grado di penetrare all'interno delle cellule solo quando la loro membrana citoplasmatica è danneggiata. Di conseguenza mentre le cellule necrotiche risultano positive alla colorazione con P.I. a causa dei danni subiti alla membrana cellulare, le cellule in apoptosi, la cui membrana è ancora integra, risulteranno negative. Quindi grazie alla combinazione di Annexina V e P.I. è possibile ottenere un profilo citofluorimetrico dove le cellule vitali risultano negative ad entrambi i markers, quelle in apoptosi risultano positive all'Annexina V e negative al P.I. mentre quelle necrotiche sono positive per entrambi i marcatori.

Brevemente, circa 1×10^6 cellule vengono centrifugate per 6 minuti a 1200 rpm. Nel frattempo, per ogni campione, si prepara un mix composto da 2 μ l di Annessina V, 2 μ l di ioduro di propidio e si porta ad un volume finale di 100 μ l aggiungendo il buffer di incubazione. Il pellet di ogni campione viene risospeso in 100 μ l di questo mix ed incubato per 15 minuti a temperatura ambiente al buio; successivamente si aggiungono 200 μ l di buffer. Le cellule, così preparate, vengono quindi analizzate al citofluorimetro. I risultati sono stati espressi come % di cellule positive all'annessina V (quindi sia apoptotiche che necrotiche).

Nel caso dell'analisi della morte cellulare sulle cellule positive per CD5 (analisi *ex vivo*), si è prima effettuata la marcatura con l'anticorpo ed in seguito quella con l'Annessina V (non è stato utilizzato lo Ioduro di Propidio in quanto la sua emissione avrebbe inficiato l'analisi del PE che è il fluoroforo coniugato all'anticorpo anti-CD5).

3.5 ANALISI DI ESPRESSIONE A LIVELLO DI mRNA

3.5.1 Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA dai pellet cellulari ai fini di analizzare il livello di espressione dei geni d'interesse, è stato utilizzato il kit "RNeasy mini kit", (Qiagen, Hilden, Germany).

Si utilizzano $0,5-5 \times 10^6$ di cellule lavate in PBS, quindi si centrifugano per 6 minuti a 1200 rpm. Si risospende il pellet in 350 μ l di buffer di lisi RLT e si procede quindi all'omogenizzazione delle cellule mediante ripetuti passaggi attraverso l'ago di una siringa (diametro < 0,9 mm). Si aggiungono 350 μ l di etanolo al 70% e, dopo aver mescolato, si trasferisce la sospensione su colonnina di purificazione (RNeasy mini column); i campioni vengono quindi centrifugati a 13000 rpm per 15 secondi. Si

procede con il trattamento con DNasi al fine di eliminare l'eventuale contaminante di DNA. A tale scopo, la colonna viene lavata con 350 µl di buffer RW1, caricata con il mix di digestione, composto da 70 µl di buffer RDD e 10 µl di DNasi, e si lascia agire 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente si esegue un ulteriore lavaggio con 350 µl di buffer RW1, seguito da 2 lavaggi con il buffer RPE. Si eluisce infine l'RNA in 30-35 µl di H₂O RNasi-free.

3.5.2 *Quantificazione dell'RNA estratto e verifica della sua qualità*

La quantificazione e la verifica della qualità dell'RNA estratto può essere effettuato con l'uso dello spettrofotometro oppure attraverso l'analisi elettroforetica.

Analisi spettrofotometrica

I campioni vengono diluiti in acqua (es: 1:50) e ne si valuta l'assorbanza (A) a lunghezze d'onda (λ) 260 e 280 nm con uno spettrofotometro. La concentrazione dell'RNA estratto è ricavabile dalla formula matematica:

$$[\text{RNA}] \text{ ng}/\mu\text{l} = A_{260\text{nm}} \times \text{fattore di diluizione} \times \text{fattore di conversione (pari a 40 per l'RNA)}$$

Analisi elettroforetica

In questo caso la valutazione della qualità e della quantità dell'RNA si effettua mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio. L'agarosio viene pesato e sciolto in un volume di TAE 1x (TAE 50x: 40 mM Tris base, 20 mM acido acetico glaciale, 1 mM EDTA pH 8), tale da ottenere una concentrazione finale pari all'1% peso/volume. Alla soluzione si aggiunge etidio bromuro (10 mg/ml). 2 µl di campione vengono diluiti in un mix composto da 8 µl di H₂O e da 2 µl di blue loading dye 6x (0,09% blu di bromofenolo, 0,09% xilene cianolo, 60% glicerolo e EDTA 60 mM)

e successivamente caricati in gel. Nello stesso gel viene caricato 1 µg di marker λ Hind III (Fermentas), le cui bande hanno lunghezza (bp) e quantità di materiale (ng) noti. Terminata la corsa elettroforetica si visualizzano le bande mediante una CCD camera interfacciata ad un computer collegato ad un transilluminatore dotato di lampada U.V. (Gel Doc 1000, Bio Rad). E' possibile quindi valutare la qualità dell'RNA (es. eventuale sua degradazione e/o presenza di DNA contaminante).

3.5.3 *Retrotrascrizione*

Per la retrotrascrizione si utilizza la SuperScript II, una trascrittasi Mo-MLV ingegnerizzata in cui l'attività endonucleasica è assente (Invitrogen Life Technologies).

Si prepara per ogni campione un primo mix contenente 0,5-1 µg di RNA e 50-250 ng di random primer portati a 11 µl con acqua sterile. Si prepara anche un campione di controllo in cui l'RNA non viene retrotrascritto (-RT).

I campioni si posizionano nel termociclatore (Thermo Hybaid, PxE 0,2) e si imposta il programma che prevede 5 minuti a 65°C. La temperatura cala quindi a 4°C per 8 minuti; in questo intervallo di tempo si aggiungono al primo mix gli altri componenti:

- 4 µl di First-Strand buffer 5x;
- 2 µl di DTT (ditiotreitolo 0,1 M);
- 1 µl di soluzione RNasi OUT (40 unità/µl);
- 1 µl di dNTPs 1 X (nucleotidi trifosfati 10 mM);
- 1 µl di SuperScript II reverse transcriptase (200 unità/µl).

Al campione -RT viene aggiunto il mix senza enzima.

Si continua con il programma di retrotrascrizione :

25°C 10'; 42°C 50'; 70°C 15'; 4°C

3.5.4 *qRT-PCR con SybrGreen*

La Real-Time PCR è una tecnologia che permette la quantificazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione. La rilevazione dei prodotti di PCR è resa possibile misurando la fluorescenza di una molecola "reporter" la quale aumenta con l'accumularsi del prodotto di reazione.

L'analisi ci fornisce, per ogni campione, un valore di "Ciclo soglia" (Ct) che viene determinato nella fase esponenziale della reazione di amplificazione ed è il ciclo in cui si ha un segnale di fluorescenza 10 volte superiore al rumore di fondo. Il Ct è dipendente dal numero di copie iniziali di template ed è tanto più alto quanto minore è la concentrazione iniziale del template: la quantità iniziale di cDNA è quindi inversamente proporzionale al numero di cicli necessario per la rilevazione. La molecola reporter da noi utilizzata è il cromoforo SybrGreen, un intercalante la cui fluorescenza è 100 volte maggiore quando è legato al doppio filamento di DNA.

Per ovviare ad eventuali differenze tra campioni nella quantità di RNA utilizzato e nell'efficienza di retrotrascrizione, il valore di espressione del gene bersaglio viene

normalizzato rispetto al valore di un gene "housekeeping" ritenuto essere espresso allo stesso livello in tutti i campioni.

Sebbene la metodica permetta una quantificazione assoluta, ai fini dello studio è stata sufficiente una quantificazione relativa, mettendo a confronto l'espressione genica nella condizione di interesse con quella nella condizione di riferimento. Ciò è stato fatto con il metodo comparativo dei Ct (metodo $\Delta\Delta Ct$) basato sulla formula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target/trattato}} - Ct_{\text{housek./trattato}}) - (Ct_{\text{target/non trattato}} - Ct_{\text{housek./non trattato}})$$

Ciclo soglia del gene target nella condizione da testare

Ciclo soglia del gene housekeeping nella condizione da testare

Ciclo soglia del gene target nella condizione di riferimento

Ciclo soglia del gene housekeeping nella condizione di riferimento

Il rapporto numerico tra l'espressione del gene bersaglio nella condizione di interesse e l'espressione dello stesso nella condizione di riferimento è ricavabile dalla formula:

$$(\text{espressione del gene target nella condizione iniziale}) = 2^{-\Delta\Delta Ct} \times (\text{espressione del gene target nella condizione finale})$$

Il valore di efficienza di reazione per tutte le coppie di primers utilizzate è compresa nell'intervallo 90-110%, condizione necessaria per applicare il metodo di analisi $\Delta\Delta Ct$.

I geni d'interesse sono indicati in tabella 1, mentre il gene "housekeeping" utilizzato è quello codificante la β_2 -microglobulina.

Ogni singola reazione di PCR è stata eseguita in duplicato in un volume di 20 μ l usando piastre ottiche da 96 pozzetti (Applied Biosystems).

Mix:

- 1 μ l cDNA;
- 10 μ l di Platinum SybrGreen qPCR SuperMix-UDG con ROX (Invitrogen Life Technologies);
- primer forward (10 μ M) e primer reverse (10 μ M) (Sigma-Aldrich Genosys) (vedi tabella);
- H₂O sterile per portare ad un volume di 20 μ l.

Lo strumento utilizzato è l'ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California, USA) ed il programma prevede:

50°C 2' / 95°C 10' /

[95°C 15" / 60°C 1'] x 40 cicli / [95°C 15" / 60°C 20" / 95°C 15"].

3.6 MANIPOLAZIONI GENETICHE

3.6.1 Produzione di vettori lentivirali e retrovirali

Il primo giorno si piastrano in una fiasca da coltura da 25 cm² 1,5 x 10⁶ cellule 293T, il giorno seguente si trasfettano con le seguenti quantità di DNA: 6 µg del costrutto di trasferimento, 3 µg del plasmide che esprime i geni *gag* e *pol* e 0,1 µg del plasmide codificante per la proteina G del virus della stomatite vescicolare. Al DNA plasmidico si aggiungono 31 µl di CaCl₂ (Fluka) e si porta ad un volume finale di 0,25 ml con H₂O. La soluzione si aggiunge, goccia a goccia, a 0,25 ml di tampone HBS 2x (274 mM NaCl, 10mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄*7H₂O, 12mM Destrosio, 42 mM HEPES, pH 7,1). Si incuba il mix di trasfezione per 20 minuti a temperatura ambiente. Si aggiunge quindi la soluzione alle cellule. Dopo 12 ore il terreno di coltura si rimuove per eliminare il calcio fosfato, e si sostituisce con 4 ml di terreno fresco di coltura. Il giorno dopo si raccoglie il surnatante virale, si centrifuga per 10 minuti a 3000 rpm si filtra con dei filtri di 0,45 µm di diametro e si aggiungono altri 4 ml di terreno fresco alla coltura. Il giorno seguente si procede con la seconda raccolta del surnatante virale come precedentemente descritto. I sovranatanti virali raccolti sono stati concentrati 70 volte mediante centrifugazione a 24000 rpm per 2 ore. Il pellet viene poi risospeso in terreno RPMI completo e conservato a -80°C.

Costrutti virali:

- MISSION shRNA; shMKP-1; shNotch3; shNotch1 (Sigma-Aldrich)
- pCMV (non codificante un transgene); pCMV-EGFP; pCMV-MKP-1 (da noi clonato, vedi in seguito); pCMV-Luciferasi
- vettore retrovirale codificante bFGF

3.6.2 Trasduzione di cellule di T-ALL

Circa 10^6 cellule di T-ALL sono piastrate per pozzetto (in piastre di coltura da 12 pozzetti) in circa 900 μ l di terreno completo a cui sono aggiunti 100-200 μ l di preparazione virale in presenza di solfato di protamina ad una concentrazione di 8 μ g/ml per facilitare l'infezione. Dopo 8-14 ore, le cellule vengono lavate con terreno semplice e poi risospese in terreno RPMI completo. Dopo 72 ore, le cellule trasdotte con il vettore codificante per l'EGFP vengono osservate al microscopio a fluorescenza o al citofluorimetro per valutare l'efficienza di trasduzione. Nel caso le cellule siano state trasdotte con i vettori codificanti per shRNA è stato possibile selezionare le cellule trasdotte per la resistenza alla puromicina, codificata da questi costrutti. A tale scopo si aggiunge puromicina al terreno di coltura alla concentrazione di 1 μ g/ml. Come controllo del processo di selezione sono state poste in terreno selettivo anche cellule parentali.

3.6.3 Elettroporazione di cellule di T-ALL

Per alcune manipolazioni genetiche non era disponibile alcun vettore virale. Tra i metodi di trasfezione disponibili si è optato quindi per l'elettroporazione in quanto più efficace sulle cellule in sospensione. Brevemente, 5×10^6 di cellule sono state lavate in PBS e risospese in buffer R a cui sono poi stati aggiunti 10 μ g di plasmide. Le cellule così preparate sono soggette ad elettroporazione (reagenti e strumento DigitalBio). Vista la bassa efficienza di trasfezione, si è quindi proceduto alla selezione dei pochi eventi di integrazione sfruttando la resistenza alla geneticina codificata dai plasmidi. Questo antibiotico viene quindi aggiunto al terreno di coltura alla concentrazione finale di 500 μ g/ml (Gibco).

Plasmidi di espressione:

- pcDNA3.1 Notch3-ICD
- pcDNA3.1 EGFP

3.7 CLONAGGIO DI MKP-1 IN UN VETTORE LENTIVIRALE

MKP-1 è stato clonato nel vettore lentivirale pRRLsin.PTTs.hCMV.EGFP.Wpre (pCMV-EGFP), precedentemente disponibile nel nostro laboratorio. L'espressione del transgene è posta sotto il controllo della sequenza *enhancer/promoter* hCMV; inoltre sono presenti sequenze aggiuntive come il *central polypurine tract* (cPPT) e il

woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE), che determinano una migliore espressione del transgene.

3.7.1 Preparazione del plasmide pCMV-MKP-1

Inizialmente è stato preparato il vettore digerendo il plasmide pCMV-EGFP con gli enzimi di restrizione XbaI e SalI (Promega), questi tagliano a monte e a valle dell'inserito EGFP e permettono di staccarlo. La reazione di digestione viene eseguita mediante incubazione di 2h a 37°C. Una parte della digestione viene fatta correre su gel di agarosio all'1% per verificare che sia stata efficace. L'altra parte della digestione viene incubata per 15 min a 65°C per inattivare l'enzima SalI, e successivamente passato su colonnina Microcon YM-30 (Millipore), per eliminare gli enzimi di restrizione (XbaI non è inattivabile al calore) ed il buffer.

Il vettore così ottenuto, privo dell'inserito EGFP, è stato defosforilato con la fosfatasi Shrimp (Roche) in modo che i prodotti della digestione (plasmide ed inserito) non possano più legarsi tra loro nella successiva reazione di ligazione.

3.7.2 Preparazione dell'inserito ("coding sequence" di MKP-1)

E' stato quindi preparato l'inserito MKP-1 mediante PCR con la polimerasi PFU (polimerasi ad alta fedeltà, dotata di attività proofreading 3'→5' esonucleasica; Promega).

I primers utilizzati per la reazione di amplificazione contengono anche la sequenza riconosciuta dagli enzimi di restrizione usati per la preparazione del plasmide.

Le condizioni della reazione di PCR sono:

95°C1'; {95°C45", 60°C1', 72°C3'} x 35 cicli; 72°C7'; 4°C

Come template è stato utilizzato il cDNA ottenuto retrotrascrivendo l'mRNA estratto dalla linea MOLT3. L'inserito quindi non è altro che la sequenza codificante MKP-1 priva di introni.

Il prodotto di PCR ottenuto è stato corso su gel di agarosio all'1%, ed è stata tagliata la banda relativa all'amplificato. Tale amplificato di MKP-1 è stato quindi estratto dal gel mediante il kit GFXTM PCR (Amersham), controllato di nuovo su gel, digerito con gli enzimi di restrizione XbaI e XhoI (Promega) al fine di "attivarne" le estremità, e purificato mediante passaggio su colonnina Microcon YM-30 (Millipore).

Il vettore (50 ng) e l'inserto (< 150 ng) così ottenuti sono stati ligati, mediante una reazione di ligazione con T₄ DNA ligasi (Promega) a 4°C per una notte.

3.7.3 Trasformazione e crescita batterica

I batteri competenti TOP10 (Invitrogen) sono stati trasformati con i prodotti di ligazione tramite shock termico. Si piastrano quindi i batteri su piastre contenenti LB agar con ampicillina 500x (30 mg/ml); segue incubazione di 14 ore a 37° C. Più colonie vengono quindi fatte crescere singolarmente in LB con ampicillina prima di estrarne il DNA per lo screening genetico.

L'estrazione del DNA dai batteri è stata eseguita secondo i protocolli mini e maxi prep Quiagen e con reagenti della stessa ditta (anche per i plasmidi usati nelle produzioni virali).

3.7.4 Verifica della presenza dell'inserto nel vettore CMV

Per verificare la presenza dell'inserto nel DNA batterico estratto, sono state eseguite due analisi: digestione enzimatica e PCR.

Digestione enzimatica

La digestione è stata eseguita con gli enzimi di restrizione EcoRI e XbaI (Promega) che tagliano a monte e a valle del transgene inserito nel plasmide, generando due frammenti, uno corrispondente all'intero plasmide della lunghezza di 6074 bp, l'altro di 1702 bp.

PCR

La seconda analisi eseguita per verificare che l'inserto MKP-1 si sia legato correttamente all'interno del plasmide d'interesse è stata la PCR (i reagenti utilizzati sono della ditta Applied Biosystems).

Le condizioni della reazione di PCR sono:

95°C10'; {95°C45", 60°C45", 72°C45"} x 30 cicli; 72°C7'; 4°C

3.7.5 Sequenziamento del vettore pCMV-MKP-1

Il sequenziamento del vettore CMV-MKP-1 è stato effettuato tramite metodo enzimatico.

I primer utilizzati sono di due tipi: il primo tipo si appaia a regioni interne alla sequenza di MKP-1, come For2, For 351, For Sybrgreen, Rev 386, Rev Sybrgreen; mentre, il secondo tipo lega regioni del vettore pCMV, come QV9 e WPRE Rev2.

Il vettore, ottenuto mediante estrazione dai batteri con maxiprep, è stato sequenziato utilizzando il kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Warrington,UK).

Il mix per il sequenziamento contiene per ogni campione:

- 4 µl di buffer 5x;
- 2 µl di Big Dye Terminator;
- 2 µl di primer (ca. 1,3 pmol);
- 1,3 µl di plasmide (ca. 300 ng);
- 10,7 µl di H₂O, per un volume finale di 20 µl.

Il programma di sequenziamento “tree steps” prevede:

- 5' 98°C;
- {10" 96°C; 5" 50°C; 4' 60°C} per 25 cicli;
- 4°C.

Terminata la reazione di sequenziamento, è necessario eseguire la purificazione su colonna per eliminare i ddNTPs e i primers in eccesso. A tale scopo, sono state utilizzate le colonne AutoSeqTM G-50 (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Successivamente, a 5 µl di ciascun prodotto della reazione di sequenza sono stati aggiunti 10 µl di formammide seguita dalla denaturazione 10 minuti a 95°C.

Per l'analisi della sequenza si è utilizzato lo strumento ABI prism 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK).

3.8 ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE

Le cellule sono state piastrate in piastra da 96 pozzetti alla concentrazione di 25×10^3 cellule/100 µl e la proliferazione è stata valutata con saggio MTS (Promega).

3.9 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati con il software StatGraphics (Statgraphics Statistical Graphics System, version 2.6)

I risultati venivano confrontati nei diversi gruppi mediante il rank test di Wilcoxon o di Mann-Whitney, ove fosse opportuno.

Tabella 1. Sequenze dei primers utilizzati.

GENE	PRIMER	SEQUENZA
MKP-1	For ^{1,2}	CGGCCATGGTCATGGAAGTG
	Rev ¹	GACTCCATGCTCCTTGAGAG
	For2 ²	AACGTCTCAGCCAATTGTC
	For351 ²	GCGCAAGTCTTCTTCCTCAA
	Rev386 ²	CGCTTCGTATCCTCCTTTGA
	For Sybr ^{2,3}	CCACCATCTGCCTTGCTTAC
	Rev Sybr ^{2,3}	AGTTTGAGTCCCAGGTGCTG
	QV9 ²	
WPRE ²	For	GCGGCCGCAATCAACCTCTGGATTACAA
WPRE ²	Rev	CAGGCGGGGAGGCGGCCCAA
β_2 - μ globulina	For ²²	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT
	Rev ²²	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
Notch3	For	CAAGGGTGAGAGCCTGATGG
	Rev	GAGTCCACTGACGGCAATCC
Notch1	For	CGCTGCACAGTAGCCTTGCT
	Rev	GCTGCTGCTGGATGTTTGCT
pTa	For	ATGGTGGTGGTCTGCCTGGT
	Rev	AGTTGGTCCAGGTGCCATCC

¹ Primers utilizzati per il clonaggio di MKP-1.

² Primers utilizzati per il sequenziamento di CMV-MKP-1.

³ Primers utilizzati per qRT-PCR di MKP-1.

4. RISULTATI

4.1 ANALISI MOLECOLARE DI TUMORI DORMIENTI E CRESCIUTI

Dati di letteratura indicano che lo stato di attivazione delle MAP chinasi, in particolare di p38 ed ERK1/2, possa svolgere un ruolo importante nell'induzione e nel mantenimento della dormienza tumorale. In particolare il rapporto P-p38/P-ERK1/2 sembra poter predire il comportamento *in vivo* delle cellule neoplastiche in alcuni modelli tumorali sperimentali di fibrosarcoma, carcinoma della prostata e della mammella. Nel modello HEP3 di Aguirre-Ghiso, ad esempio, la tumorigenicità è il risultato non solo dell'iperattivazione del pathway di ERK, ma anche dell'inibizione di quella di p38⁸²⁻⁸⁵. Infatti, lo spostamento dell'equilibrio p38/ERK1/2 in favore di ERK risulta nella tumorigenicità, mentre il prevalere di p38 induce uno stato di dormienza tumorale.

4.1.1 Stato di attivazione delle MAP chinasi ERK1/2 e p38

Sulla base quindi dei dati di letteratura, si è deciso di procedere con l'analisi dell'espressione di fosfo-p38 (P-p38), p38, fosfo-ERK1/2 (P-ERK1/2) ed ERK1/2 mediante Western Blot al fine di verificare il rapporto tra lo stato di attivazione di queste due vie di signalling correlasse o meno con lo stato di dormienza. A questo proposito, l'analisi dei lisati ottenuti da 8 masse dormienti e 9 cresciute ha dato esito negativo (Fig. 10A ed 10B). Il rapporto tra l'attivazione della via di ERK1/2 e quella di p38 è infatti uguale nelle nostre due condizioni sperimentali. Tuttavia, nonostante il bilancio tra le pathway sia simile, si è potuto apprezzare come lo stato di dormienza sia caratterizzato dall'attivazione di entrambe le vie mentre la crescita tumorale è associata a bassi livelli sia di fosfo-p38 che di fosfo-ERK1/2 (Fig. 10A ed 10C). Infatti, la media del rapporto P-p38/p38 nei tumori cresciuti è pari ad 1.7 mentre nei tumori dormienti è pari a 4. Analogamente ERK1/2 è maggiormente attivo nei tumori dormienti rispetto a quelli cresciuti, infatti la media del rapporto P-ERK/ERK passa da 1.9 per i tumori cresciuti a 5.7 per i tumori dormienti (Fig. 10C).

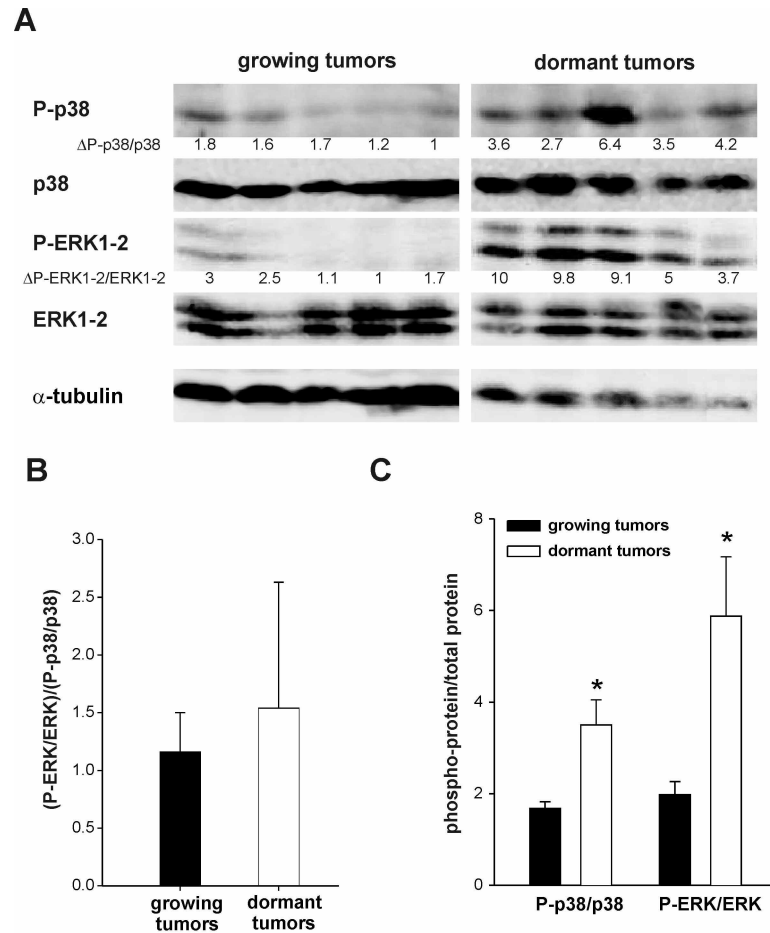


Figura 10. Analisi dello stato di attivazione delle chinasi p38 ed ERK1/2 nei tumori dormienti e cresciuti. **A)** Analisi mediante Western Blot dell'espressione di P-p38, p38, P-ERK1/2 ed ERK1/2 in 5 campioni rappresentativi di tumori cresciuti e 5 di tumori dormienti. **B)** e **C)** I dati quantitativi sono stati ottenuti mediante analisi densitometrica delle relative bande di Western Blot corrispondenti a 9 tumori cresciuti e 8 tumori dormienti. In grafico sono riportate le medie dei rapporti proteina fosforilata/proteina totale con le relative deviazioni standard. I valori misurati nei tumori dormienti risultano significativamente superiori sia per $\Delta P\text{-p38/p38}$ che per $\Delta P\text{-ERK/ERK}$ (* = $p=0.012$).

4.1.2 Analisi dei livelli di espressione della fosfatasi MKP-1

Il risultato dell'analisi delle MAP chinasi, pur mostrando una situazione diversa da quella che ci saremmo attesi, ha comunque evidenziato delle significative differenze tra tumori dormienti e cresciuti. Tali differenze sollevano quindi l'importante quesito su quale possa esserne la causa. Vari studi presenti in letteratura indicano p38 ed ERK1/2 come possibili bersagli della fosfatasi MKP-1. Essa è codificata da un "immediate early gene" la cui espressione è stimolata da vari stimoli e che determina l'inattivazione delle MAP chinasi; in particolare MKP-1 defosforila p38/JNK>ERK^{90, 91}.

Abbiamo dunque analizzato, mediante Western Blot, i livelli di espressione di questa fosfatasi nelle stesse masse di tumori dormienti e cresciuti precedentemente analizzate per l'espressione delle MAP chinasi.

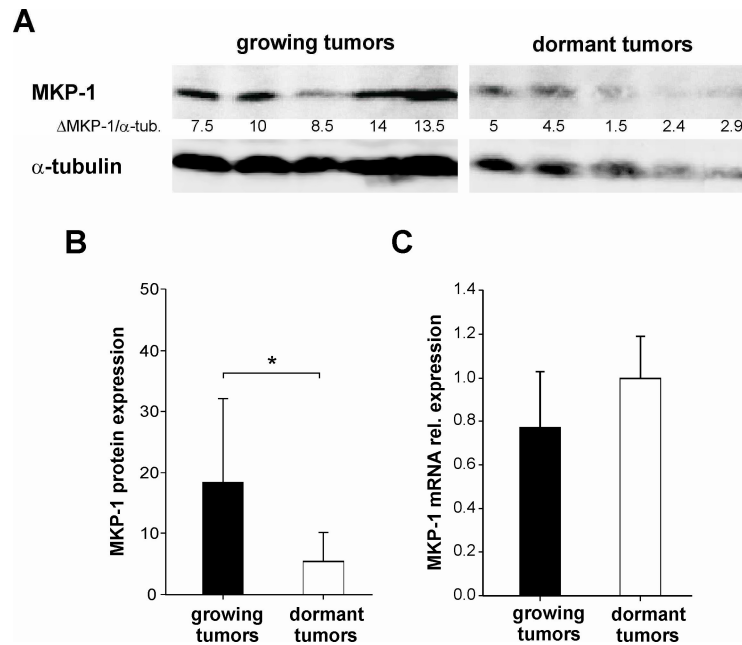


Figura 11. Livelli di espressione della fosfatasi MKP-1 nei tumori cresciuti e dormienti. **A)** Analisi mediante Western Blot dell'espressione proteica di MKP-1 in campioni rappresentativi di tumori cresciuti e di tumori dormienti. **B)** I tumori cresciuti presentano livelli di espressione proteica di MKP-1 significativamente maggiori rispetto ai tumori dormienti (* = $p=0.009$; $n=8-9$ campioni per gruppo). **C)** Curiosamente i livelli di espressione di MKP-1 a livello di mRNA non sono diversi tra i due tipi di tumore (media e deviazione standard di 6 tumori cresciuti contro 4 dormienti).

Come riportato in figura 11A e B, l'espressione di MKP-1 a livello proteico è maggiore nei tumori cresciuti rispetto a quelli dormienti. I dati di Western Blot suggeriscono che l'espressione di MKP-1 sia inversamente correlata all'attivazione delle MAP chinasi; infatti, i tumori che mostrano maggiori livelli di fosforilazione delle chinasi p38 ed ERK1/2 esprimono minori livelli di MKP-1 e viceversa. Questi risultati indicano che MKP-1 potrebbe essere responsabile della defosforilazione e quindi dell'inattivazione di p38 ed ERK1/2 nel nostro modello, ed in particolare nell'uscita dalla dormienza tumorale.

Curiosamente, questa differenza di espressione a livello proteico non è accompagnata da una corrispondente differenza a livello di mRNA come evidenziato tramite analisi di PCR quantitativa effettuata su 6 tumori cresciuti contro 4 dormienti (Fig 11C).

4.2 STUDIO DELLE LINEE DERIVATE DALLE DIVERSE VARIANTI TUMORALI

Successivamente, abbiamo analizzato tramite Western Blot ed immunofluorescenza i livelli di espressione di tale fosfatasi nelle linee cellulari derivate dai tumori dormienti (TD) e dai tumori cresciuti (TC). In accordo con quanto avevamo osservato nelle masse tumorali (Fig. 11), le linee cellulari derivate dai tumori cresciuti presentano una maggiore espressione di MKP-1 rispetto a quelle derivate dai tumori dormienti (Fig. 12A e B). Per determinare se tali differenze avessero un significato funzionale, si è deciso di valutare la risposta cellulare di queste cellule ad uno stimolo proapoptotico quale l'anisomicina, in quanto la risposta a questo antibiotico è nota essere influenzata dai livelli di MKP-1¹¹³. Le cellule così trattate sono state quindi analizzate al citofluorimetro dopo marcatura con annessina V/Ioduro di Propidio (PI), in modo da evidenziare le cellule in apoptosi. Tale analisi ha dimostrato come le cellule derivate da tumori cresciuti siano significativamente più resistenti all'anisomicina ($p < 0.001$), supportando quindi l'idea che MKP-1 possa avere un ruolo funzionale nel nostro modello (Fig. 12C).

Poiché sappiamo che solo le linee TC sono tumorigeniche, e che la resistenza all'apoptosi nei primi giorni dall'inoculo gioca un ruolo importante nel nostro modello {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}, siamo andati a valutare l'apoptosi di queste cellule nelle prime fasi di crescita tumorale. Cellule TC e TD inoculate in MATRIGEL sono state quindi recuperate dopo soli 5 giorni dall'inoculo *in vivo* e sono state marcate con Annessina V/PI e con un anticorpo anti CD5, un marcatore specifico per queste cellule. E' stata quindi valutata al citofluorimetro la percentuale di cellule apoptotiche tra quelle positive per CD5. Come evidente in Fig. 12D, le cellule derivate da tumore cresciuto sono molto più resistenti rispetto a quelle derivate da tumore dormiente ($p < 0.001$).

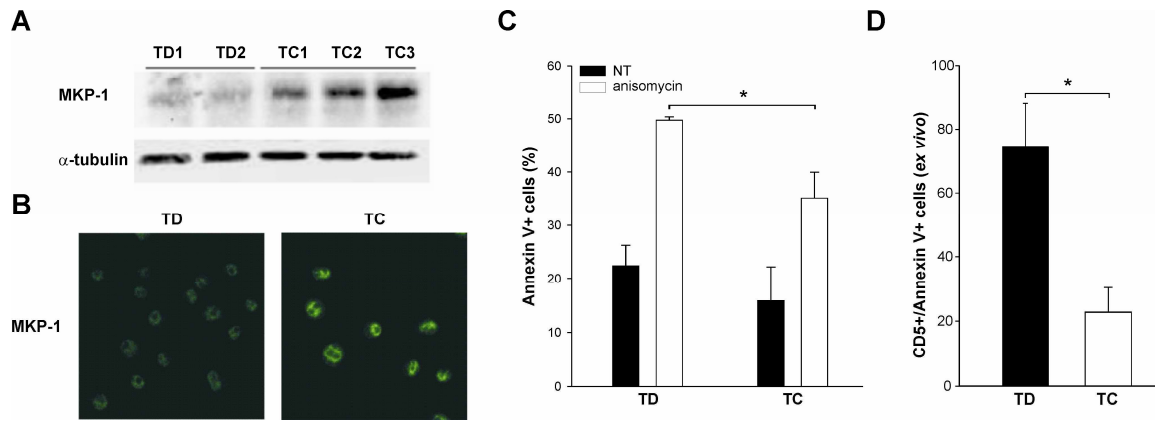


Figura 12. Analisi molecolare e funzionale di linee TC e TD. **A)** Analisi di Western Blot per l'espressione di MKP-1 su 2 diverse linee derivate da tumori dormienti e 3 derivate da masse cresciute. **B)** Stesso tipo di analisi eseguita tramite metodica di immunofluorescenza (una linea rappresentativa per variante). **C)** Valutazione dell'apoptosi nelle linee TD e TC dopo trattamento con anisomicina (media e deviazione standard di 3; * = $p < 0.001$). **D)** Analisi dell'apoptosi di cellule TD e TC ($CD5^+$) dopo 5 giorni dall'inoculo *in vivo*. Per lo studio sono state analizzate le cellule recuperate da 3 inoculi per variante cellulare (* = $p < 0.001$).

4.3 ESPRESSIONE DI MKP-1 ED ATTIVAZIONE DI NOTCH3 IN T-ALL

Poiché in precedenza è stato messo in evidenza come la condizione di crescita tumorale nel nostro modello sia caratterizzata dall'attivazione di Notch3 nelle cellule di leucemia {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}, è stato nostro interesse verificare se ci fosse una correlazione tra l'espressione di MKP-1 e lo stato funzionale di questo recettore. Per prima cosa abbiamo quindi analizzato, tramite Western Blot, i livelli di MKP-1 e Notch3-ICD in un pannello di 13 linee di T-ALL (Fig.13A) ed in 8 campioni clinici di leucemia linfoblastica acuta dell'adulto (Fig. 13B). Come risulta evidente in Figura 13, i livelli di MKP-1 correlano generalmente bene con lo stato di attivazione di Notch3 (dimostrato dai livelli di Notch3-ICD) in quanto solo in 2 linee cellulari su 13 (P12-ICHI e SKW3) ed in un solo campione primario su 8 (campione # 7) i livelli di queste due proteine non sembrano essere correlati.

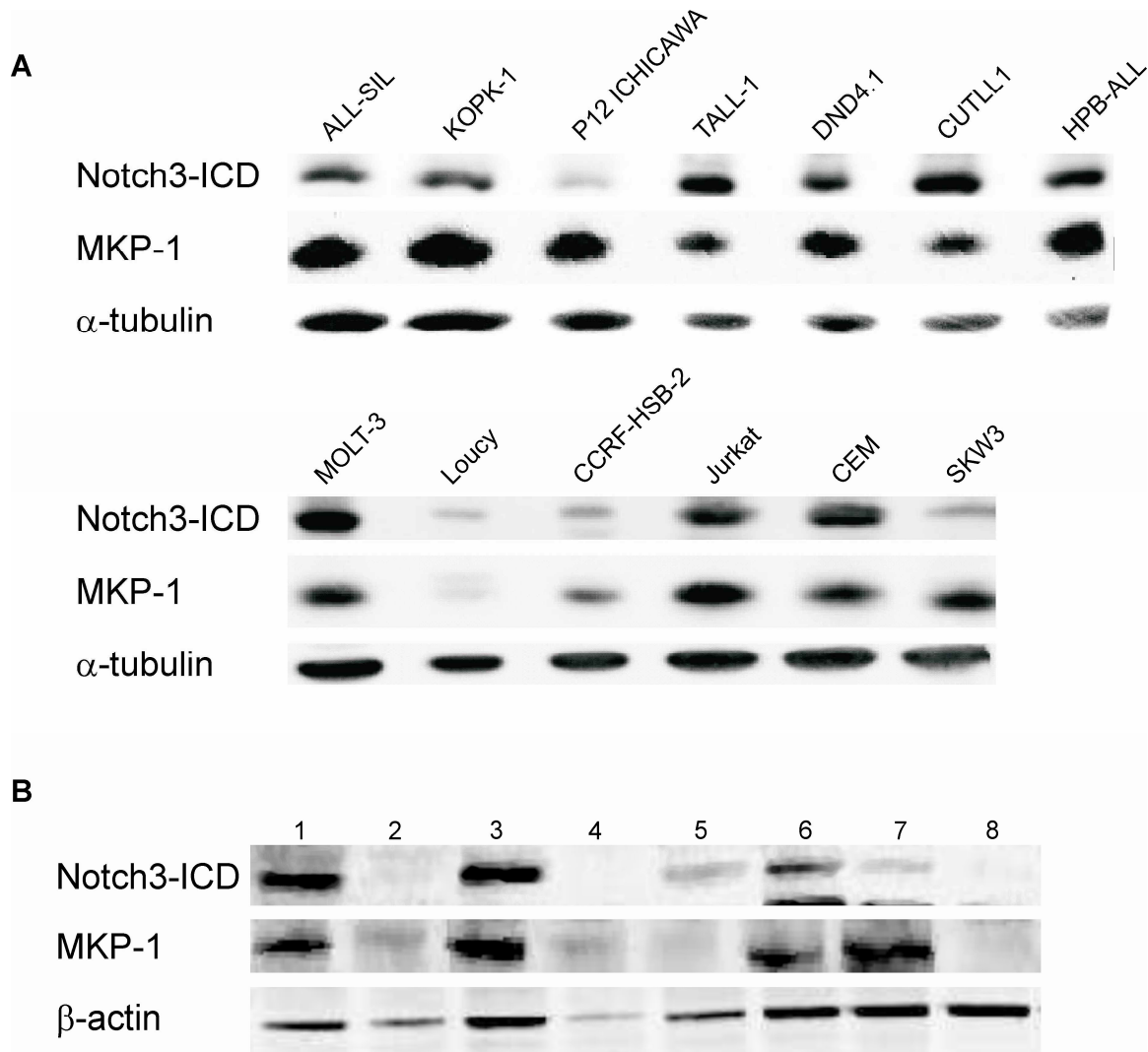


Figura 13. Correlazione tra i livelli di MKP-1 e Notch3-ICD. **A)** Analisi di Western Blot dell'espressione di Notch3-ICD ed MKP-1 su 13 linee di T-ALL. **B)** Stesso tipo di analisi su una serie di campioni primari umani di leucemia linfoblastica acuta dell'adulto.

4.4 MODULAZIONE DEL SIGNALLING DI NOTCH E CONSEGUENZE SULL'ESPRESSIONE DI MKP-1

Al momento attuale sono molto poche le pubblicazioni che mettono in relazione l'espressione di MKP-1 con l'attività dei recettori Notch ed inoltre, tali lavori non sono concordi su quella che può essere la relazione tra queste proteine^{121, 122}.

4.4.1 Effetto degli inibitori delle γ -secretasi

Un metodo comunemente utilizzato per ridurre il signaling di Notch si basa sull'utilizzo degli inibitori delle γ -secretasi, enzimi fondamentali nell'attivazione di questa classe di recettori ⁷. Al fine quindi di verificare se l'espressione di MKP-1 potesse essere influenzata dall'attività di Notch, abbiamo trattato diverse linee di T-ALL con due di questi composti (GSI e Compound E) in modo da essere certi che gli effetti osservati fossero legati all'attività biologica del composto piuttosto che ad un suo effetto aspecifico. Il trattamento con questi inibitori si è dimostrato in grado di ridurre i livelli di Notch3-ICD e parallelamente anche quelli proteici di MKP-1 (Fig. 14A e B), in maniera dose dipendente (Fig. 14A). L'analisi dei livelli di espressione dell'mRNA codificante MKP-1 tramite PCR quantitativa non ha tuttavia evidenziato alcuna variazione indotta da questo trattamento (Fig. 14C).

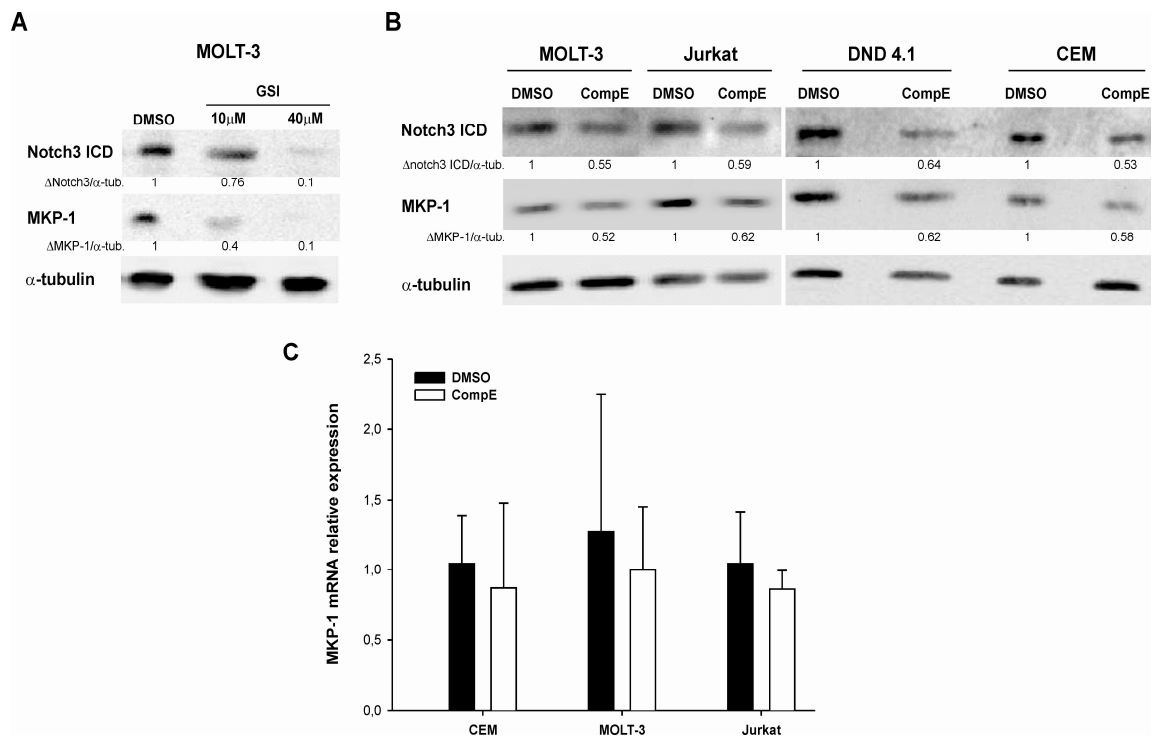


Figura 14. Effetto degli inibitori delle γ -secretasi sull'espressione di MKP-1. **A)** Analisi dell'espressione proteica di MKP-1 tramite Western Blot della linea MOLT-3 trattata con GSI a diverse concentrazioni (un esperimento rappresentativo). **B)** Analisi dell'espressione di MKP-1 tramite Western Blot di 4 diverse linee di T-ALL trattate con il Compound E (un esperimento rappresentativo). **C)** PCR quantitativa sull'mRNA di cellule trattate con il Compound E (media e deviazione standard di 3 esperimenti).

4.4.2 Conseguenze della stimolazione con Dll4

Sulla base delle nostre ricerche precedenti {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}, abbiamo deciso di valutare gli effetti dell'attivazione di Notch sull'espressione di MKP-1, stimolando le cellule di T-ALL in modo "fisiologico" con il ligando Dll4. In queste stesse ricerche avevamo inoltre dimostrato che Dll4 attiva Notch3 nelle cellule da noi utilizzate. A tale scopo quindi, le cellule vengono coltivate per 48 ore in piastre ricoperte con una forma ricombinante murina di questa proteina. Si è scelto di utilizzare questa forma di Dll4 in quanto i nostri studi si basano su osservazioni fatte nell'ospite murino.

Dopo 2 giorni le cellule vengono raccolte ed analizzate per l'espressione di MKP-1 sia a livello proteico che di mRNA. Sia l'analisi effettuata tramite immunofluorescenza (Fig. 15A e B) che tramite Western Blot (Fig. 15C) dimostrano come la stimolazione con Dll4 sia in grado di aumentare l'espressione di MKP-1. Tuttavia, anche in questo caso, i livelli di mRNA non risultano essere modulati (Fig. 15D) a differenza di quelli di un noto gene bersaglio di Notch quale pT α ($p < 0.001$).

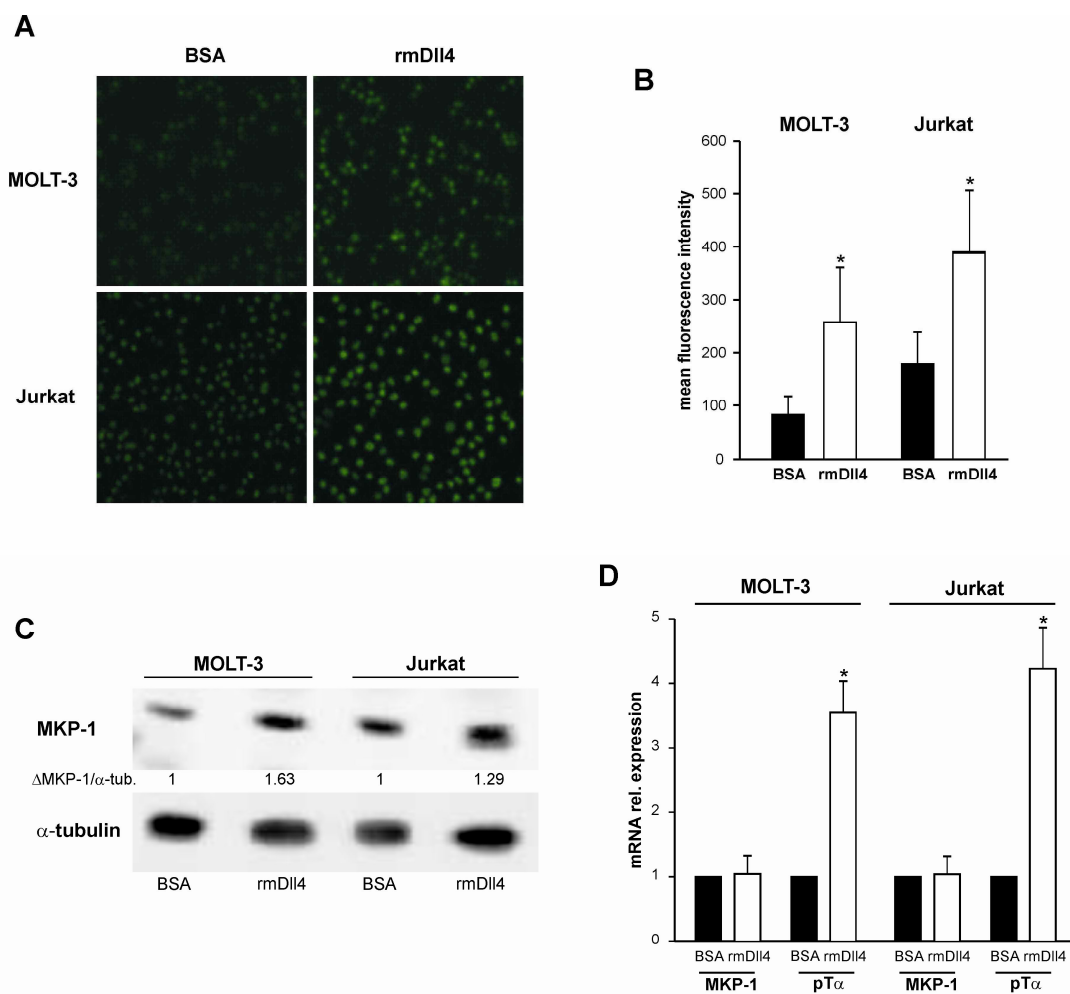


Figura 15. Conseguenze della stimolazione con Dll4 sull'espressione di MKP-1. **A)** Analisi dell'espressione proteica di MKP-1 tramite immunofluorescenza delle linee MOLT-3 e Jurkat stimulate con Dll4 (immagine di un esperimento rappresentativo). **B)** Quantificazione dell'intensità media di fluorescenza relativa all'analisi di immunofluorescenza presentata (media e deviazione standard calcolate su 100 cellule per trattamento; * = $p < 0.05$). **C)** Analisi di Western Blot delle stesse cellule (un esperimento rappresentativo). **D)** PCR quantitativa per i livelli di espressione di MKP-1 e pTα (media e deviazione standard di 3 esperimenti; * = $p < 0.001$).

4.4.3 Conseguenze della modulazione del signaling di Notch3

Poiché i nostri studi precedenti hanno evidenziato come Notch3 sia centrale nel nostro modello {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}, abbiamo deciso di valutare le conseguenze delle manipolazioni dei livelli di espressione di questo specifico recettore sull'espressione di MKP-1. A tale scopo sono stati utilizzati 2 approcci opposti e complementari. Sono state generate cellule di T-ALL esperimenti in modo transgenico il Notch3-ICD tramite elettroporazione di un plasmide codificante il dominio intracellulare attivo di questo recettore. Sono state generate anche cellule silenziate per l'espressione di Notch3 tramite trasduzione con un vettore lentivirale codificante uno

"short hairpin" RNA in grado di silenziare l'mRNA bersaglio tramite meccanismo di "RNA interference".

L'analisi dell'espressione proteica ha inequivocabilmente dimostrato come lo stato di attivazione di Notch3 (rappresentato dal Notch3-ICD) sia un fattore importante nel determinare i livelli di MKP-1 in quanto l'aumento del dominio intracellulare attivo causa un incremento nei livelli di questa fosfatasi (Fig. 16A) mentre il silenziamento di Notch3 induce una riduzione degli stessi (Fig. 16C). Per quanto riguarda l'mRNA codificante MKP-1, si è dimostrato che il silenziamento di Notch3 non ne altera i livelli (Fig. 16D), in accordo con quanto precedentemente osservato. L'espressione forzata del Notch3-ICD invece, oltre a determinare un aumento dei livelli dell'mRNA di pT α , causa anche un leggero aumento nei livelli dell'mRNA di MKP-1 (Fig. 16B).

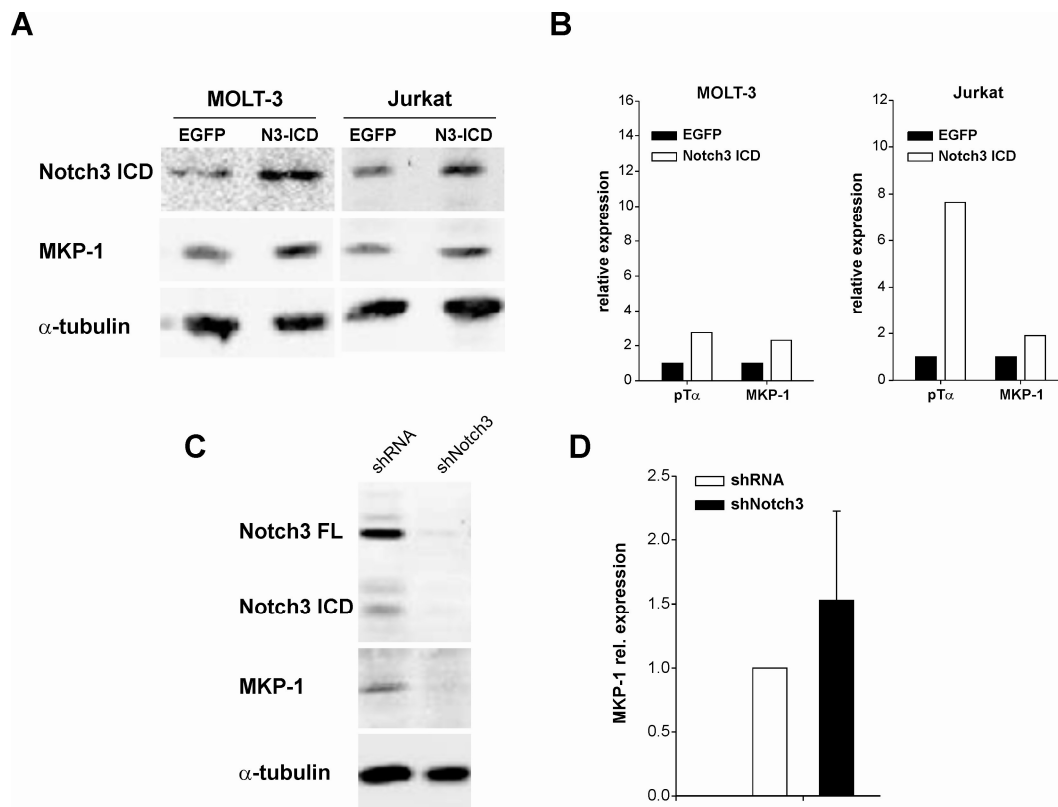


Figura 16. Conseguenze della modulazione dei livelli di Notch3-ICD sull'espressione di MKP-1.

A) Analisi dell'espressione di MKP-1 tramite Western Blot di cellule MOLT-3 e Jurkat overesprimenti il Notch3-ICD. **B)** PCR quantitativa per pT α ed MKP-1 sulle stesse cellule. **C)** Analisi dell'espressione di MKP-1 tramite Western Blot di cellule MOLT-3 silenziate per Notch3 (immagine di un esperimento rappresentativo). **D)** PCR quantitativa per MKP-1 su cellule silenziate per Notch3 (media e deviazione standard di 3 esperimenti).

4.4.4 Inibizione dell'interazione Dll4-Notch3 *in vitro* ed *in vivo*: effetti sui livelli di MKP-1

Dalle nostre precedenti ricerche sappiamo che le cellule endoteliali sono in grado di attivare Notch3 in cellule di T-ALL tramite Dll4. Un semplice saggio per valutare questo tipo di interazione consiste nel co-cultivare le cellule di leucemia con cellule endoteliali {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}. Per confermare quindi che l'attivazione "naturale" di Notch3 (quindi in seguito ad una interazione cellula-cellula) potesse influenzare l'espressione di MKP-1, si è deciso di valutare quest'ultima in cellule MOLT-3 co-coltivate in presenza o meno di un anticorpo neutralizzante Dll4. L'analisi di Western Blot delle cellule di leucemia così trattate ha evidenziato come la co-coltura, oltre ad indurre l'attivazione di Notch3, è in grado di up-regolare l'espressione di MKP-1 (Fig. 17A). Tali effetti sono fortemente inibiti dall'aggiunta dell'anticorpo neutralizzante (Fig. 17A).

Il trattamento con lo stesso anticorpo anti-Dll4 è in grado di inibire la crescita *in vivo* nel nostro modello tumorale e, cosa molto importante, impedisce anche in questo caso l'attivazione di Notch3 associata all'uscita dalla dormienza {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}. Abbiamo deciso quindi di verificare le evidenze ottenute *in vitro* sulla relazione tra MKP-1 e Notch3 anche *in vivo*. I tumori recuperati da animali trattati o meno con questo anticorpo sono stati analizzati tramite Western Blot per l'espressione di MKP-1 e per i livelli di Notch3-ICD. Questa analisi ha dimostrato come l'inibizione *in vivo* dell'attivazione di Notch3 determini anche una diminuzione dell'espressione di MKP-1 in cellule di T-ALL (Fig. 17B), confermando i dati da noi finora ottenuti.

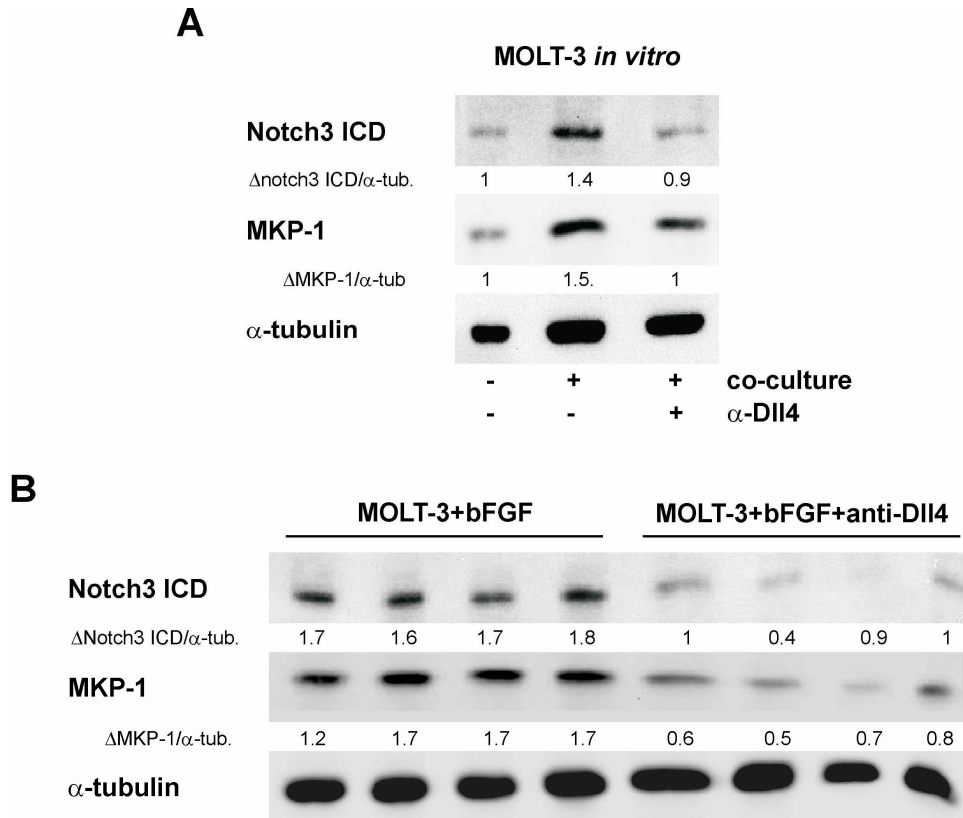


Figura 17. Conseguenze del trattamento con anti-Dll4 sull'espressione di MKP-1.

A) Analisi di Western Blot di cellule MOLT-3 co-coltivate con cellule endoteliali SIEC o meno. La co-coltura induce l'attivazione di Notch3 associata all'aumento di MKP-1. Entrambi questi effetti sono inibiti dalla neutralizzazione di Dll4 (esperimento rappresentativo). **B)** Analisi di Western Blot di tumori MOLT-3 trattati o meno con un anticorpo neutralizzante Dll4 (4 tumori rappresentativi per gruppo).

4.4.5 Studio del meccanismo che lega MKP-1 a Notch3 nel nostro modello

Dimostrato che Notch3 è in grado di regolare l'espressione di MKP-1, è stato necessario valutare quello che poteva essere il meccanismo alla base di tale relazione. Nonostante le funzioni di questa classe di recettori siano per lo più collegate all'attività trascrizionale del loro dominio intracellulare, i dati di PCR quantitativa da noi ottenuti suggeriscono che, nel nostro caso sia implicato un meccanismo di altro tipo. E' noto dalla letteratura che l'ICD di Notch1 è in grado di ridurre la degradazione della fosfatasi XIAP, prevenendone l'ubiquitinazione¹²³. La conseguenza di questa interazione è la protezione della cellula dall'apoptosi. Lo scenario sembra quindi essere molto simile a quello che noi stiamo descrivendo nel nostro modello, e cioè che l'attivazione di uno dei recettori Notch possa proteggere dalla morte cellulare programmata, attraverso la stabilizzazione di una fosfatasi. Sulla base di questa informazione e dei dati che indicano la stabilità proteica come un fattore importante nell'attività di MKP-1⁹⁴⁻⁹⁸,

abbiamo valutato le conseguenze della modulazione del signalling di Notch sull'ubiquitinazione di questa fosfatasi.

Cellule MOLT-3 e Jurkat sono state trattate con il Compound E ed i loro lisati sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione contro MKP-1. I campioni così ottenuti sono stati analizzati in Western Blot per la presenza di ubiquitina. Il risultato ottenuto dimostra come il trattamento determini un aumento delle forme poli-ubiquitinate di MKP-1 (visualizzate come uno "smear"; Fig. 18A).

Anche in questo caso abbiamo dimostrato come l'effetto ottenuto sia specifico in quanto il trattamento con 2 diversi inibitori delle γ -secretasi (GSI e Compound E) porta allo stesso risultato (Fig. 18B). Per confermare il ruolo del signalling di Notch sulla stabilità di MKP-1, ne è stata valutata l'ubiquitinazione in presenza di aumentati livelli di Notch3-ICD. L'analisi di Western Blot su immunoprecipitati ottenuti da cellule Jurkat transgeniche per il dominio intracellulare attivo di Notch3 dimostrano minori livelli di MKP-1 ubiquitinato rispetto alle cellule di controllo Jurkat EGFP (Fig. 18C).

Questi risultati dimostrano quindi che il signalling di Notch3 è in grado di modificare i livelli proteici di MKP-1 in cellule di T-ALL riducendone l'ubiquitinazione ed aumentandone così l'emivita, chiarendo quindi le differenze da noi osservate nel nostro modello sperimentale.

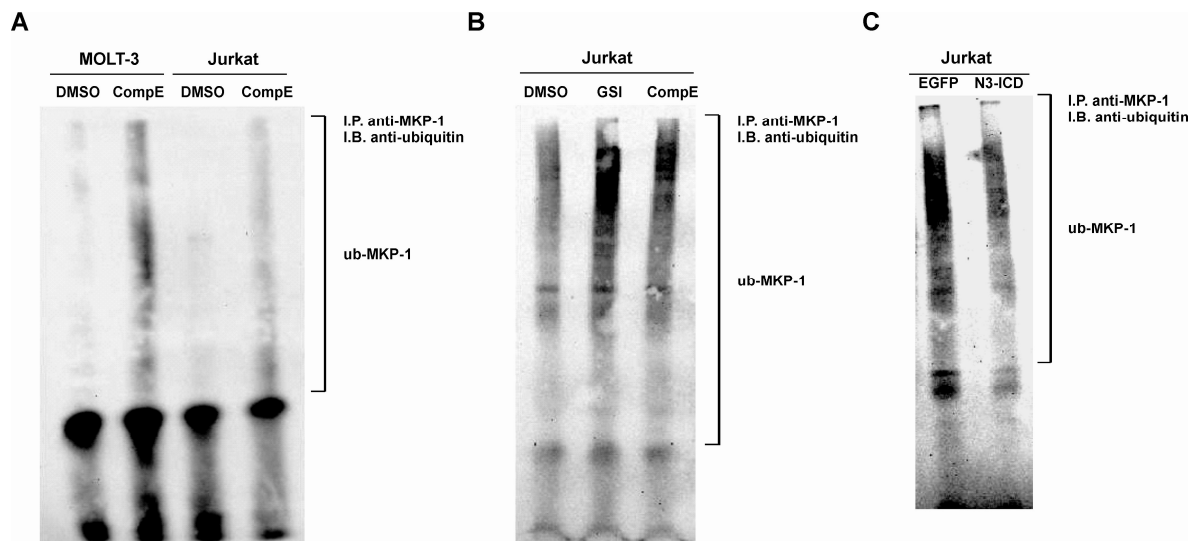


Figura 18. Conseguenze della modulazione del signalling di Notch sull'ubiquitinazione di MKP-1. Analisi di Western Blot per i livelli di ubiquitina su immunoprecipitati (I.P.) contro MKP-1: **A)** il trattamento con Compound E su cellule di T-ALL determina un aumento nell'ubiquitinazione di MKP-1; **B)** questo effetto è comune a 2 diversi inibitori delle γ -secretasi (GSI e Compound D) confermandone quindi la specificità; **C)** l'aumento dei livelli di Notch3-ICD determina una riduzione nei livelli di MKP-1 ubiquitinato. (I.P.=ImmunoPrecipitato; I.B.=ImmunoBlot).

4.5 RUOLO DI MKP-1 NELL'APOPTOSI IN CELLULE DI T-ALL

Determinata quella che è la causa degli aumentati livelli di MKP-1 nel nostro modello, è stata presa in considerazione quella che poteva essere la conseguenza di tale espressione.

I nostri studi precedenti hanno evidenziato come una importante differenza tra tumori cresciuti e dormienti risieda nei livelli di apoptosi¹²⁰ e come il signalling di Notch3 abbia un ruolo anti-apoptotico in cellule di T-ALL {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}. Sulla base di queste informazioni e della notevole mole di letteratura indicante MKP-1 come una proteina dalle capacità protettive, abbiamo deciso di studiare le conseguenze sulla morte cellulare delle variazioni dei livelli di questa fosfatasi.

4.5.1 Aumentati livelli di MKP-1 hanno un effetto protettivo nei confronti di stimoli pro-apoptotici

Per studiare gli effetti dell'up-regolazione di questa proteina è stato necessario clonare la sequenza codificante MKP-1 in un vettore di espressione lentivirale (vedi materiali e metodi).

Con questo vettore sono state trasdotte le cellule MOLT-3 ed è stata quindi confermata l'aumentata espressione di MKP-1 tramite immunofluorescenza (Fig. 19A). Per valutare la funzionalità della proteina transgenica, le cellule così manipolate sono state trattate con stimoli in grado di indurre l'attivazione di p38 (anisomicina e cisplatino)^{75, 113}. L'analisi dei livelli di fosfo-p38 in queste cellule ha evidenziato una ridotta fosforilazione nelle cellule overesprimenti MKP-1, confermando l'efficacia della nostra manipolazione (Fig. 19B). Per valutare l'impatto di MKP-1 sull'apoptosi, abbiamo trattato le nostre cellule con diversi stimoli apoptotici: anisomicina e cisplatino, la cui efficacia è nota essere regolata dai livelli di MKP-1^{75, 113, 116-119}; totale deprivazione di siero, un tipo di stress cellulare che potrebbe simulare le condizioni a cui sono esposte tali cellule *in vivo*. Le cellule così trattate sono state marcate con Annexina V/PI ed analizzate al citofluorimetro per i livelli di apoptosi. Questa serie di esperimenti ha dimostrato come aumentati livelli di MKP-1 siano in grado di proteggere significativamente le cellule MOLT-3 da tutti gli stimoli utilizzati (Fig. 19C; $p < 0.05$). Questa stessa serie di prove è stata eseguita anche su cellule Jurkat manipolate

geneticamente con gli stessi vettori, confermando i dati ottenuti sulle MOLT-3 (Fig. 19D; $p < 0.05$).

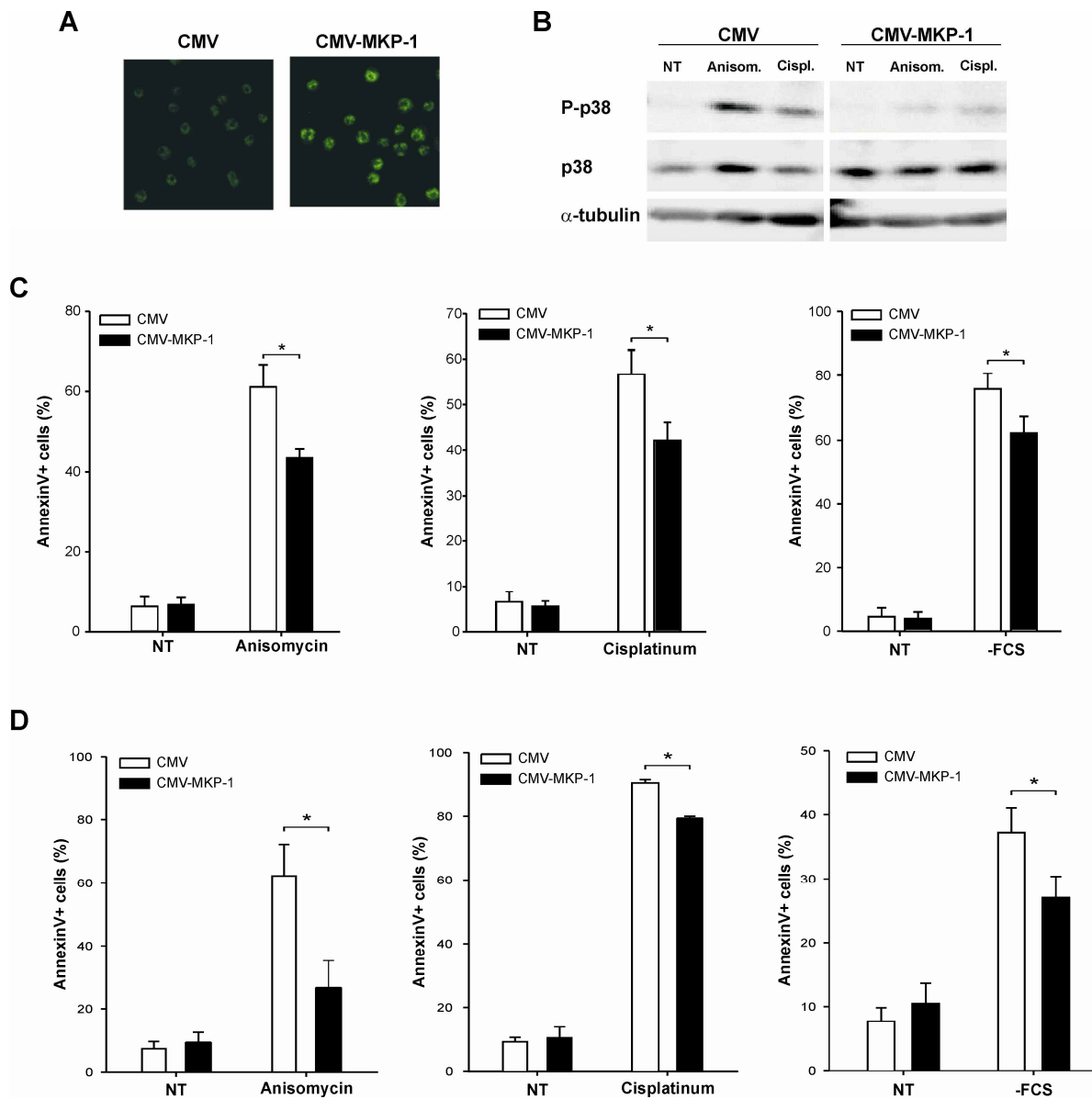


Figura 19. Manipolazione in positivo dei livelli di MKP-1 e conseguenze sull'apoptosi.

A) Analisi di immunofluorescenza delle cellule MOLT-3 trasdotte con il nostro vettore codificante MKP-1 oppure con un vettore di controllo. **B)** Analisi di Western Blot delle cellule manipolate e trattate con stimoli in grado di attivare p38. **C)** Analisi dell'apoptosi indotta da anisomicina, cisplatino e deprivazione di siero in cellule MOLT-3 trasdotte (media e deviazione standard di 3 esperimenti; * = $p < 0.05$). **D)** Analisi dell'apoptosi indotta da anisomicina, cisplatino e deprivazione di siero in cellule Jurkat trasdotte (media e deviazione standard di 3 esperimenti; * = $p < 0.05$ per anisomicina e deprivazione di siero, * = $p < 0.001$ per cisplatino).

4.5.2 Il silenziamento di MKP-1 sensibilizza le cellule nei confronti di diversi stimoli pro-apoptotici

Le cellule MOLT-3 sono state trasdotte con un vettore lentivirale commerciale codificante uno "short hairpin" RNA contro MKP-1 o con un vettore di controllo e sono poi state selezionate.

I livelli di espressione sono stati valutati anche in questo caso tramite tecnica di immunofluorescenza (Fig. 20A). Le cellule così ottenute sono state trattate con anisomicina, cisplatino o coltivate in assenza di siero. Questi esperimenti hanno confermato il ruolo anti-apoptotico di MKP-1 evidenziato con le prove di overespressione in quanto il silenziamento di questa proteina sensibilizza le cellule nei confronti di tutti e 3 gli stimoli utilizzati (Fig. 20B; $p < 0.05$).

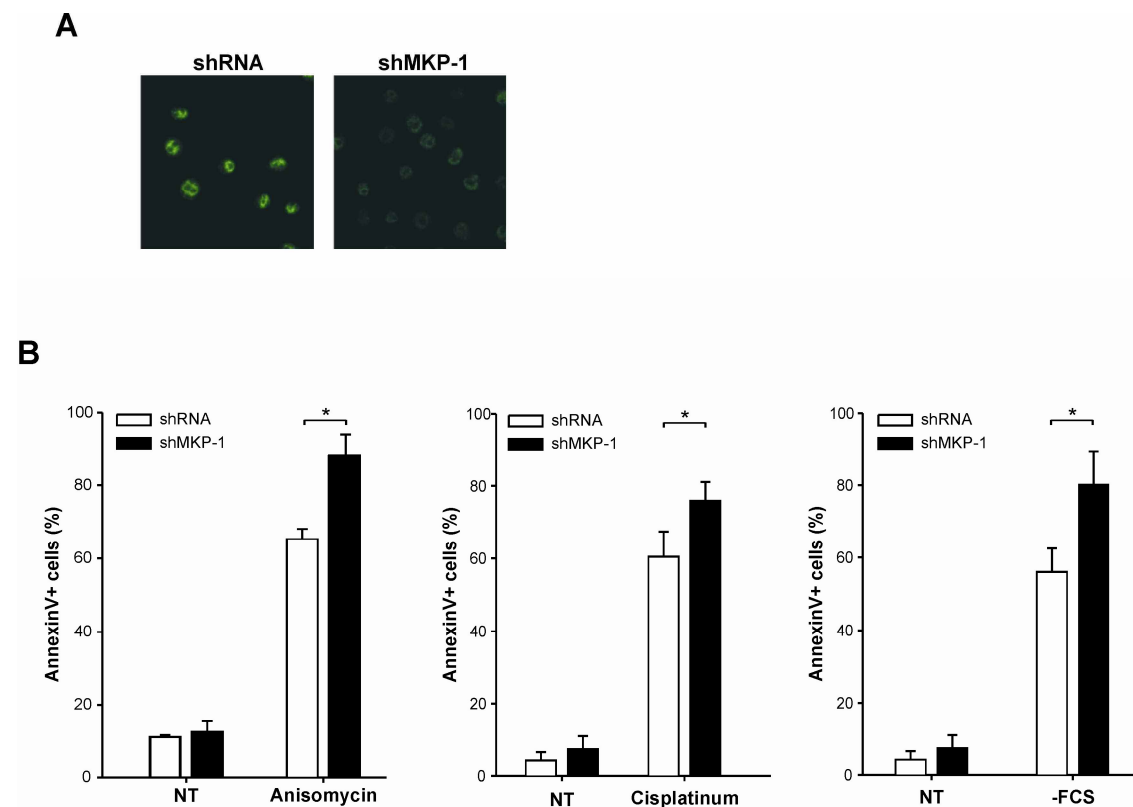


Figura 20. Manipolazione in negativo dei livelli di MKP-1 e conseguenze sull'apoptosi.

A) Analisi di immunofluorescenza delle cellule MOLT-3 trasdotte con il vettore silenziante MKP-1 oppure con il vettore di controllo. **B)** Analisi dell'apoptosi indotta da anisomicina, cisplatino e deprivazione di siero in cellule MOLT-3 trasdotte (media e deviazione standard di 3 esperimenti; * = $p < 0.05$).

4.6 CONSEGUENZE DELLA MANIPOLAZIONE DI MKP-1 *IN VIVO*

Forti delle nostre osservazioni sull'apoptosi, abbiamo deciso di valutare le conseguenze della manipolazione dei livelli di MKP-1 nel nostro modello di dormienza tumorale.

Prima però di passare *in vivo* abbiamo voluto escludere che le manipolazioni dei livelli di MKP-1 avessero qualche effetto sulla proliferazione delle nostre cellule. L'analisi tramite saggio MTS non ha evidenziato alcuna differenza tra le diverse varianti di MOLT-3 (Fig. 21A).

In tutti questi esperimenti *in vivo* sono state utilizzate cellule MOLT-3 esprimenti l'enzima luciferasi (MOLT-3 luc⁺), in modo da poter seguire meglio la crescita tumorale soprattutto nelle fasi in cui questa non è ancora visibile esternamente. Le analisi tramite tecniche di "imaging" degli animali sono sempre state fatte settimanalmente a partire dal settimo giorno successivo a quello dell'inoculo.

Nel primo esperimento, cellule MOLT-3 luc⁺ overesprimenti MKP-1 e di controllo sono state inoculate s.c. su entrambi i fianchi di topi immunodeficienti NOD/SCID. Questo tipo di manipolazione non ha avuto alcun effetto nel nostro modello di dormienza in quanto nessuno degli inoculi ha poi dato origine ad un tumore, mentre il controllo positivo, rappresentato da cellule MOLT-3-bFGF, ha indotto tumori. Questo risultato indica che MKP-1 da sola non è sufficiente a conferire un fenotipo tumorigenico alle cellule di T-ALL.

Abbiamo quindi voluto valutare l'effetto della riduzione dei livelli di MKP-1 nel fenomeno dell'uscita dalla dormienza tumorale. A questo proposito cellule MOLT-3 luc⁺ silenziate o meno per MKP-1 sono state inoculate s.c. in MATRIGEL in presenza di fattori angiogenici quale il bFGF.

E' importante ricordare che, secondo i nostri studi precedenti,¹²⁰ {Indraccolo, 2009 in pubblicazione} questo è un metodo per indurre la crescita di queste cellule, altrimenti dormienti.

Gli animali sono stati quindi valutati settimanalmente tramite "imaging" e visivamente per lo sviluppo di masse misurabili. L'analisi della curva di crescita dimostra come non ci sia una differenza significativa nelle dimensioni medie dei 2 tipi di tumore seppure sia visibile una tendenza di quelli silenzianti ad essere più piccoli (Fig. 21B). L'analisi di "imaging" è concorde con l'analisi delle dimensioni ma ha anche evidenziato una differenza significativa nelle fasi in cui le masse non erano ancora misurabili (terza settimana; p=0.02). Infatti, i tumori non silenzianti appaiono prima di quelli ottenuti da

cellule con ridotti livelli di MKP-1 (Fig. 21C e D). Questa osservazione è perfettamente in accordo con il dato secondo cui il signalling di Notch3 è importante nel proteggere dall'apoptosi soprattutto nelle prime fasi dello sviluppo di questi tumori ed in particolare nelle fasi preangiogeniche di crescita {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}.

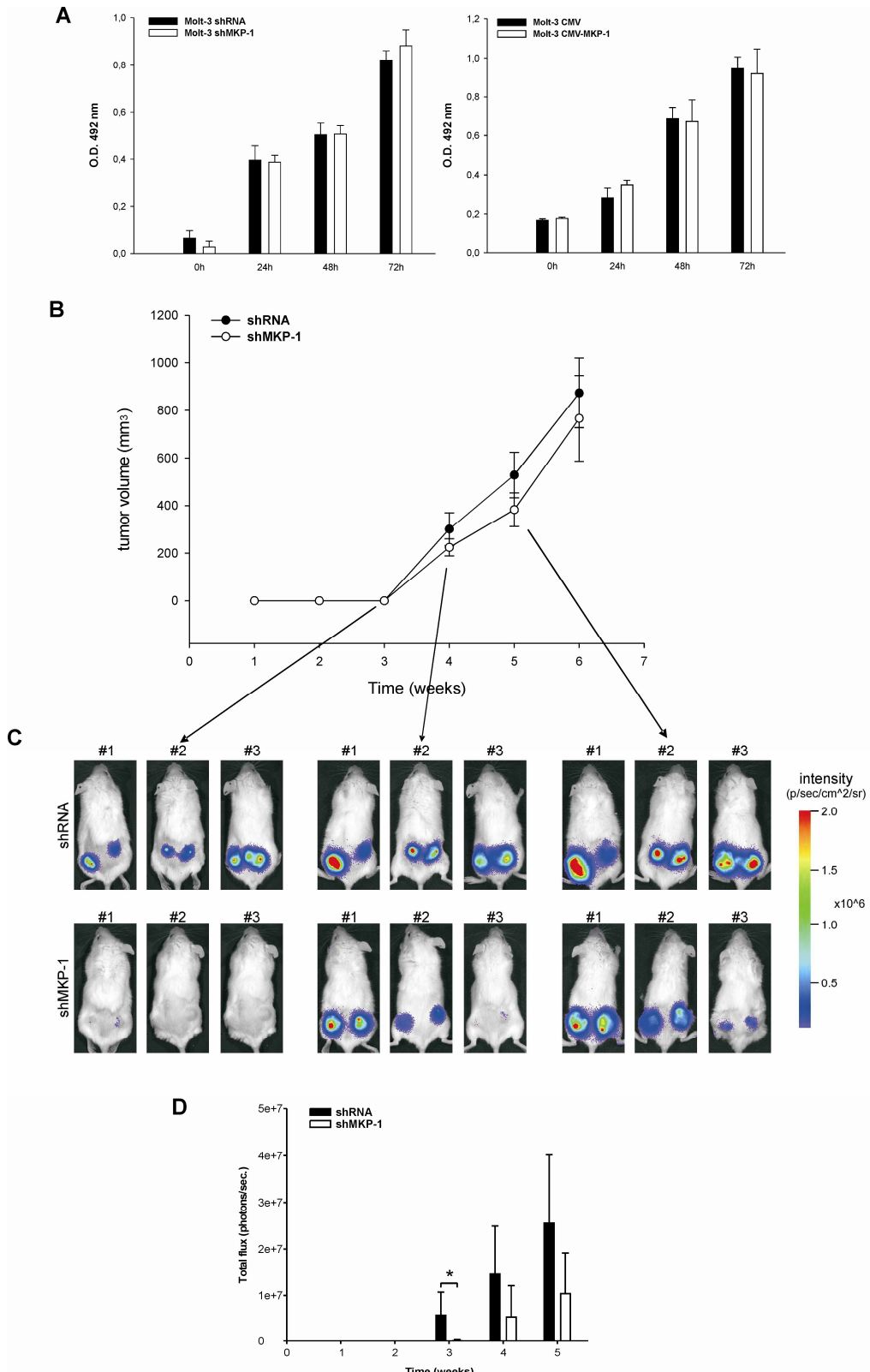


Figura 21. Effetti della manipolazione dei livelli di MKP-1 sulla tumorigenicità di cellule MOLT-3.
A) Analisi della proliferazione tramite saggio MTS di cellule MOLT-3 esprimenti diversi livelli di MKP-1. **B)** Curva di crescita delle cellule silenziate per MKP-1 (shMKP-1) e loro variante di controllo (shRNA). **C)** Immagini ottenute tramite "live imaging" degli animali a 3 diversi intervalli di tempo. **D)** Quantificazione dei dati di "live imaging" (differenza significativa con $p=0.02$ alla terza settimana).

4.7 POSSIBILI IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Vista l'espressione di MKP-1 rilevata nelle linee e nei campioni clinici di T-ALL e la correlazione tra i livelli di questa fosfatasi e la risposta apoptotica a diversi stimoli, ci siamo posti il quesito se anche in questo tipo di neoplasia l'efficacia di alcuni farmaci potesse essere influenzata dai livelli di questa fosfatasi. Per prima cosa abbiamo valutato l'induzione dell'apoptosi e l'effetto sull'attivazione di p38 di una serie di chemioterapici usati abitualmente in clinica per la cura di questo tipo di tumore. Cellule MOLT-3 sono state quindi trattate con doxorubicina, etoposide, topotecano, mitoxantrone e vincristina. I lisati cellulari sono stati analizzati in Western Blot per i livelli di PARP/PARP clivato (la comparsa del secondo è indice di apoptosi) e per la presenza di p38 fosforilato (forma attiva). Questa analisi ha permesso di individuare il topotecano ed il mitoxantrone come 2 farmaci efficaci (buoni livelli di PARP clivato), la cui attività pro-apoptotica potrebbe essere influenzata dai livelli di MKP-1, data l'importante attivazione di p38 osservata (Fig. 22A).

Abbiamo quindi iniziato a valutare se aumentati livelli di MKP-1 potessero effettivamente influenzare la risposta a questi farmaci. Cellule MOLT-3 overesprimenti MKP-1 sono state quindi trattate col mitoxantrone e la percentuale di apoptosi è stata valutata col metodo dell'Annexina V/PI. Tale analisi ha evidenziato come aumentati livelli di questa fosfatasi siano in grado di proteggere cellule di T-ALL dal trattamento con mitoxantrone, un chemioterapico normalmente usato per trattare questo tipo di leucemia (Fig. 22B; $p=0.03$).

Seppure agli inizi di questa parte dello studio, sembra quindi plausibile che i livelli di espressione di MKP-1 possano influenzare la risposta terapeutica, rappresentando quindi un possibile fattore predittivo di risposta per le T-ALL.

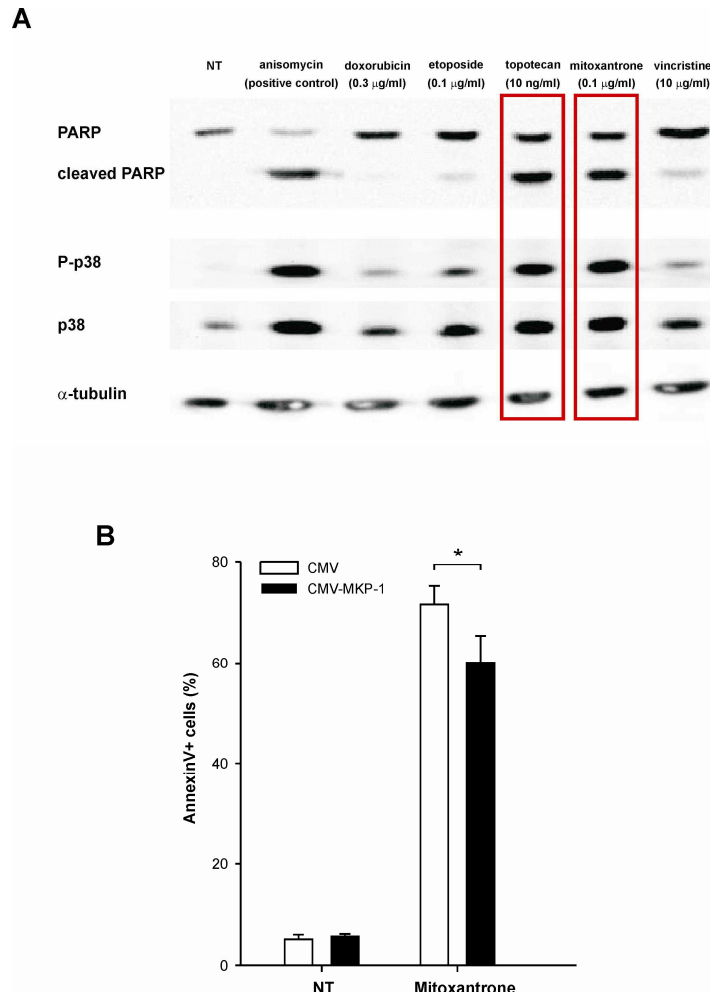


Figura 22. Livelli di espressione di MKP-1 e la terapia delle T-ALL.

A) Analisi di Western Blot dell'effetto di alcuni chemioterapici sull'apoptosi (visualizzata tramite il rapporto PARP/PARP clivato) e sull'attivazione di p38 in cellule MOLT-3. **B)** Analisi dell'apoptosi indotta da mitoxantrone in cellule MOLT-3 overesprimenti MKP-1 (media e deviazione standard di 3 esperimenti; * = $p=0.03$).

5. DISCUSSIONE

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è un'emopatia maligna dei timociti caratterizzata da un alto numero di linfoblasti T circolanti e nel midollo e rappresenta il 10-15% dei casi di leucemia acuta in età pediatrica ed il 25% dei casi in età adulta. Un ruolo importante in questo tipo di neoplasia è giocato dal pathway di Notch^{4, 32}, un meccanismo evolutivamente conservato che controlla una vasta gamma di processi cellulari riguardanti la crescita ed il differenziamento. Il recettore Notch è una proteina di membrana che, in seguito all'interazione con il suo ligando, anche esso proteina di membrana, subisce due tagli proteolitici che determinano il rilascio della porzione intracellulare (ICD) nel citoplasma. Questo viene poi traslocato nel nucleo dove funge da fattore di trascrizione. Nei vertebrati superiori la famiglia del Notch è costituita da quattro recettori in grado di interagire con vari ligandi⁹. E' stato inoltre dimostrato che questa stessa via di signalling gioca un ruolo molto importante nella biologia delle cellule endoteliali ed in particolare nel processo angiogenico. A questo proposito notevole importanza è stata data al ligando Dll4, in particolare durante la formazione di neo-vasi indotta durante la crescita tumorale^{10, 124}.

Un ambito di studio in cui l'angiogenesi sembra avere un ruolo importante è quello che si occupa della dormienza tumorale. Questo fenomeno è caratterizzato dalla presenza di cellule tumorali che possono rimanere quiescenti in vari tessuti, condizione nella quale si ha una neoplasia asintomatica per un lungo periodo di tempo⁶⁸. In generale questa condizione di mancata crescita è caratterizzata da un equilibrio tra proliferazione e morte cellulare e ciò può essere il risultato della mancanza di angiogenesi che, almeno nei tumori solidi, induce una riduzione dei nutrienti necessari al tumore per crescere⁶⁷. Svvariati sono comunque i meccanismi che si sono dimostrati poter essere coinvolti nella dormienza tumorale. Uno di questi vede coinvolte le MAP chinasi (Mitogen Activated Protein Kinase) ERK e p38, ed in particolare il rapporto tra lo stato di attivazione dell'una rispetto all'altra. Nello specifico, i lavori di Aguirre-Ghiso dimostrano come l'asse uPA/uPAR sia in grado di promuovere la proliferazione cellulare sia attraverso l'attivazione della via di ERK, sia riducendo quella di p38, responsabile del blocco in fase G₀/G₁ del ciclo cellulare^{82, 83, 84, 85}. In generale, numerosi studi hanno dimostrato che le isoforme di p38 sono coinvolte nell'induzione del blocco del ciclo cellulare e nell'apoptosi, nella regolazione negativa della trasformazione neoplastica e nella carcinogenesi⁸⁰. Inoltre, p38 e le MAP chinasi della famiglia JNK hanno un ruolo

importante nell'apoptosi indotta da alcuni farmaci usati nella terapia dei tumori ^{125, 75}. Lo stato di attivazione delle MAP chinasi è critico e quindi deve essere finemente regolato al fine di controllare processi quali la proliferazione cellulare, lo sviluppo, l'apoptosi, il differenziamento e l'infiammazione. L'attivazione delle MAPKs, in risposta a vari stimoli, è un processo reversibile e le fosfatasi svolgono un ruolo importante nel controllare l'attività di queste chinasi ⁸⁷. MKP-1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-1), anche detta DUSP1 (dual specificity phosphatase-1) o CL100, è codificata da un "immediate-early gene" (IEG) e viene indotta da una notevole varietà di stimoli, spesso gli stessi che attivano la cascata delle MAPKs. L'esposizione della cellula a questi, induce l'espressione di MKP-1 che defosforila le MAPKs, inattivandole ^{89, 90}. Tale fosfatasi presenta una maggiore affinità per p38/JNK ed infine per ERK. L'attività di MKP-1 è a sua volta controllata da molteplici meccanismi che comprendono regolazione sia a livello trascrizionale che post-traduzionale, tramite la modulazione della sua stabilità e della sua degradazione attraverso il proteasoma ^{126, 127, 128, 96}. Il coinvolgimento di MKP-1 in ambito oncologico è stato oggetto di molte ricerche ed in tale campo di ricerca si trova grande consenso riguardo la correlazione tra l'espressione di MKP-1 e protezione dall'apoptosi ¹¹³, in particolare per quanto riguarda la risposta delle cellule tumorali a diversi farmaci chemioterapici. E' noto infatti che diversi farmaci usati in ambito oncologico (quali ad esempio composti del platino, etoposide ed inibitori dei microtubuli) hanno tra i mediatori dei loro effetti pro-apoptotici due dei possibili substrati di questa fosfatasi, quali p38 e JNK. Questi studi hanno messo in evidenza come, in diversi tipi di neoplasia (carcinoma ovarico, polmonare e della mammella, glioma ed osteosarcoma), la maggiore espressione di MKP-1 abbia l'effetto di proteggere le cellule tumorali dall'azione di questi farmaci ^{75, 117, 116, 115, 112}.

Allo stato attuale ben pochi lavori hanno messo in relazione il signalling del Notch con l'espressione di MKP-1 e la conseguente regolazione delle MAP chinasi ^{122, 121}.

Nel nostro laboratorio è stato sviluppato e studiato un modello di dormienza tumorale basato su cellule di leucemia acuta T dell'adulto (T-ALL). Nel nostro "setting" sperimentale, quando le cellule di leucemia T MOLT-3 vengono inoculate sotto cute in topi immunodeficienti NOD/SCID, sono in grado di generare solo piccole masse avascolari a causa del loro ridotto potenziale angiogenico. Se però si induce la formazione di nuovi vasi, la linea MOLT-3 acquisisce capacità tumorigenica. Una importante differenza tra le due condizioni di crescita è che i tumori dormienti sono

caratterizzati da elevati livelli di apoptosi rispetto ai tumori aggressivi ¹²⁰. Le nostre ricerche hanno poi messo in evidenza come il processo angiogenico non giochi un ruolo importante esclusivamente nel rifornire di ossigeno e nutrienti la massa neoplastica. È stato infatti dimostrato che le cellule endoteliali, ancora prima di dare origine a vasi sanguigni formati e funzionali, sono in grado di trasmettere un segnale di sopravvivenza alle cellule tumorali attraverso un'interazione cellula-cellula, tra il ligando Dll4 espresso sulla membrana plasmatica delle cellule endoteliali ed il recettore Notch3 espresso dalle cellule neoplastiche {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}. Poiché quindi il Notch signalling gioca un ruolo molto importante nel sostenere la crescita delle leucemie T, l'obiettivo iniziale di questo lavoro di tesi è stato quello di indagare, nel nostro modello sperimentale, i meccanismi attivati dall'interazione Dll4-Notch3 in grado di indurre resistenza a stimoli pro-apoptotici nelle cellule di T-ALL e di favorire l'uscita dallo stato di dormienza tumorale.

Per prima cosa, memori dei lavori di Aguirre-Ghiso e colleghi, siamo andati a valutare lo stato di attivazione delle MAP chinasi ERK1/2 e p38. Tale analisi ha dimostrato come il rapporto di attivazione tra questi due enzimi non sia, nel nostro modello, predittivo di crescita/dormienza, in quanto molto simile nelle due condizioni. Tuttavia è stato osservato che la condizione di dormienza è caratterizzata da una sostanziale attivazione di entrambe le vie che invece risultano essere pressoché silenti in condizioni di crescita tumorale. Tale differenza ha quindi sollevato il quesito su quale potesse esserne la ragione. Poiché in letteratura è stato descritto che MKP-1 è un importante regolatore sia di ERK1/2 che di p38 ^{90, 91}, abbiamo deciso di valutarne l'espressione. L'analisi a livello di mRNA non ha evidenziato alcuna differenza mentre quella a livello proteico ha riscontrato una maggiore espressione nei tumori cresciuti, in perfetto accordo con la condizione di spegnimento delle MAP chinasi che caratterizza questi. Abbiamo inoltre dimostrato che tale differenza ha un significato funzionale in quanto il trattamento con anisomicina risulta essere più efficace nelle cellule derivate da tumori dormienti, che esprimono minori quantità di MKP-1. Queste stesse cellule inoltre risultano essere più sensibili anche allo stress che si manifesta nei primi giorni dall'inoculo *in vivo*, evidenza che aiuta ulteriormente a spiegare la loro scarsa capacità tumorigenica. Poiché i nostri studi precedenti avevano collegato la crescita *in vivo* all'attivazione di Notch3 nelle cellule di T-ALL ad opera del suo ligando Dll4 {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}, abbiamo deciso di indagare l'ipotesi che proprio questa interazione tra tumore e microambiente fosse responsabile degli aumentati livelli

di MKP-1. A sostegno di questa teoria è stato importante riscontrare come i livelli di Notch3-ICD (forma attiva del recettore) ben correlino con quelli di MKP-1 in una serie di linee cellulari e campioni clinici di T-ALL. Non è comunque sorprendente avere trovato alcune eccezioni a questa correlazione in quanto è possibile che anche altri pathway determinino i livelli di questa fosfatasi, visti i numerosi livelli di regolazione a cui è sottoposta ed i molti stimoli in grado di regolarne l'espressione. Al fine però di dimostrare formalmente che l'attivazione di Notch3 inducesse l'aumento di MKP-1, sono stati svolti diversi esperimenti sia *in vitro* che *in vivo*. A questo proposito è stato dimostrato che il trattamento con inibitori delle γ -secretasi è in grado di ridurre l'espressione di questa fosfatasi e che l'attivazione di Notch tramite il suo ligando Dll4 determina un aumento dei livelli di MKP-1. La manipolazione genetica dei livelli di Notch3-ICD in cellule di T-ALL ha poi definitivamente confermato le precedenti osservazioni in quanto l'espressione del dominio intracellulare del recettore o il silenziamento dello stesso determinano rispettivamente l'up-regolazione e la down-regolazione di MKP-1. A validazione di questi risultati sarà di sicuro interesse valutare nel prossimo futuro quelle che sono le conseguenze del trattamento con gli inibitori delle γ -secretasi su cellule overesprimenti il Notch3-ICD, in quanto ci si aspetta che in questo caso il blocco del clivaggio del recettore non abbia alcuna conseguenza sull'espressione di MKP-1. Questi dati sono stati ulteriormente confermati dall'evidenza che l'attivazione fisiologica (indotta da un'interazione cellula-cellula) di Notch3 in cellule di leucemia è associata all'aumento di MKP-1 e che questo è abrogato dal blocco dell'interazione Dll4/Notch3 sia *in vitro* che *in vivo*.

Poiché in tutti questi esperimenti le variazioni dei livelli proteici di MKP-1 non erano associati a corrispondenti cambiamenti nell'espressione dell'mRNA, abbiamo cercato di chiarire quale potesse essere il meccanismo regolatorio alla base di tale "discrepanza". In letteratura è descritto ampiamente che la quantità di questa fosfatasi è finemente regolata a diversi livelli, e tra questi un ruolo importante sembra essere svolto dalla regolazione della sua degradazione attraverso il proteasoma^{91, 92, 93, 94, 95, 96, 98}. Ad ulteriore supporto dell'ipotesi che meccanismi di stabilizzazione potessero essere coinvolti nel nostro modello, è utile ricordare che altre ricerche hanno già dimostrato come un altro membro della famiglia dei recettori Notch (Notch1) sia in grado di proteggere dall'apoptosi tramite la stabilizzazione di un'altra fosfatasi chiamata XIAP¹²³. Gli esperimenti svolti hanno in questo caso dimostrato che la modulazione del signalling di Notch3 determina un cambiamento nei livelli di ubiquitinazione di MKP-1,

confermando quindi il coinvolgimento di meccanismi di stabilizzazione proteica nella regolazione di questa fosfatasi ad opera di Notch3. A tal riguardo, ci proponiamo in futuro di indagare più in dettaglio quali possano essere i protagonisti di tali meccanismi, in quanto alcuni fattori importanti per la stabilità di questa fosfatasi sono già noti. Tra è bene ricordare l'ubiquitina ligasi Skp-2⁹⁶, enzima implicato nella degradazione di MKP-1 ed in parte descritto essere regolato dal signalling di Notch^{22, 129}.

Dimostrato quindi il nesso che lega i livelli di espressione di MKP-1 alla condizione di crescita nel nostro modello di dormienza tumorale, ci siamo interessati a quello che poteva essere il ruolo di questa proteina nelle T-ALL. A tale scopo abbiamo utilizzato dei vettori lentivirali per modularne i livelli (il costrutto per overesprimere MKP-1 è stato da noi appositamente generato per questo studio). Dalle nostre analisi è risultato evidente che le manipolazioni dei livelli di MKP-1 non hanno alcun effetto sulla proliferazione cellulare mentre la risposta apoptotica a diversi stimoli ne è chiaramente influenzata in quanto questa fosfatasi dimostra avere una significativa capacità protettiva. Questi risultati sono perfettamente in accordo con quanto già descritto dal nostro gruppo in quanto le differenze tra tumori cresciuti e dormienti stanno proprio a livello di apoptosi e non di proliferazione¹²⁰, {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}.

Sulla base di questi risultati abbiamo deciso di studiare l'impatto delle manipolazioni dei livelli di MKP-1 sul comportamento *in vivo* delle cellule MOLT-3 valutandone le capacità tumorigeniche. Tali esperimenti hanno dimostrato come questa proteina da sola non sia sufficiente a indurre la crescita di cellule non tumorigeniche in quanto cellule MOLT-3 overesprimenti MKP-1 non danno origine a tumori. L'esperimento contrario ha invece evidenziato come cellule silenziate abbiano una tendenza, seppur non significativa, a dare masse più piccole rispetto ai controlli quando le MOLT-3 sono rese tumorigeniche tramite co-inoculo di fattori angiogenici. Questo stesso esperimento ha inoltre evidenziato che il silenziamento di MKP-1 è in grado di ostacolare significativamente la crescita tumorale nelle prime fasi dello sviluppo neoplastico quando le masse non sono ancora visibili. Questi risultati sembrano indicare che l'up-regolazione di MKP-1 possa essere uno dei meccanismi pro-tumoralis innescati dall'attivazione di Notch3 nel nostro modello sperimentale, e che sono poi responsabili della scelta tra dormienza e crescita tumorale. Il fatto che MKP-1 giochi un ruolo significativo nelle primissime fasi dello sviluppo tumorale è in accordo col dato che Notch3 sia importante proprio nella sopravvivenza delle cellule nella fase preangiogenica della crescita neoplastica {Indraccolo, 2009 in pubblicazione}.

Ci proponiamo inoltre di valutare se gli effetti osservati *in vivo* siano legati o meno alla protezione dall'apoptosi e, nello specifico, sarà quindi interessante valutare se cellule con diversi livelli di MKP-1 presentino anche, come atteso, diversi livelli di apoptosi nelle prime fasi di crescita tumorale. L'idea che l'espressione di MKP-1 possa essere un fattore promuovente la crescita tumorale nelle fasi precoci della crescita tumorale è ulteriormente rinforzata da altri studi che dimostrano l'overespressione di questa fosfatasi nei primi stadi della malattia mentre i suoi livelli vanno progressivamente riducendosi nei tumori di grado superiore e nelle metastasi ^{101, 102}.

L'interesse nei confronti di questa proteina si è anche parzialmente esteso a quello che potrebbe essere il suo coinvolgimento nella risposta alla terapia e quindi al suo possibile significato come fattore predittivo nella cura di questa neoplasia. Abbondante è infatti la letteratura che indica MKP-1 come una proteina dalle capacità protettive nei confronti di un ampio spettro di farmaci antineoplastici in diversi modelli tumorali ^{74, 101-119}. In aggiunta, anche nel nostro modello sperimentale questa proteina si è dimostrata capace di proteggere le cellule tumorali da diversi stimoli pro-apoptotici. Abbiamo quindi individuato il mitoxantrone, tra i farmaci utilizzati nella terapia delle T-ALL, in quanto oltre ad essere efficace è in grado di attivare p38. Seppure siano ancora parziali, i risultati indicano che l'overespressione di MKP-1 ha un effetto protettivo nelle cellule MOLT-3 nei confronti dell'azione di questo composto.

I risultati ottenuti con questo lavoro di tesi hanno quindi permesso di dissecare in parte quelli che sono i meccanismi alla base dell'uscita dalla dormienza nel nostro modello sperimentale. Più in generale, questi hanno contribuito a "svelare" una nuova funzione di Notch3, una funzione che si manifesta con la stabilizzazione di una proteina, un meccanismo che seppur già descritto da Liu et al. ¹²³, risulta comunque poco consueto per questa classe di recettori.

Anche il bersaglio di tale attività è alquanto "intrigante" in quanto la stabilizzazione di MKP-1 rappresenta un possibile meccanismo di interazione tra due importanti vie di signalling quali quella del Notch e delle MAP chinasi. Questa ipotesi è inoltre già sostenuta da Kondoh et al. ¹²² e rappresenta un ambito di studio molto interessante sia in ambito oncologico che di biologia di base.

Dal punto di vista traslazionale inoltre, questo studio ha evidenziato il generale ruolo anti-apoptotico di MKP-1 nelle T-ALL che, tenuto conto anche del fatto che Notch3 è spesso overespresso in questo tipo di leucemia ³², solleva il quesito sul possibile coinvolgimento di questa fosfatasi nella risposta alla terapia di questo tipo di leucemia.

Le prospettive di continuazione di questo filone di ricerca sono diverse ed articolate. Innanzitutto stiamo iniziando a verificare i dati ottenuti nel modello sotto cute in un modello di crescita più consono ad una neoplasia ematologica, inoculando quindi le cellule per via endovenosa e lasciandole crescere come leucemia. A questo scopo si stanno utilizzando sia linee cellulari che campioni primari umani. Dati preliminari dimostrano inoltre presenza di Dll4, attivazione di Notch3 e forte espressione di MKP-1 nelle normali sedi di accumulo di queste cellule neoplastiche quali i linfonodi e la milza, ed un maggiore livello di apoptosi delle cellule tumorali ottenute da quest'ultima sede in animali trattati con l'anticorpo neutralizzante Dll4.

Di notevole interesse sarebbe inoltre poter confermare le nostre osservazioni anche in modelli transgenici di T-ALL. A questo proposito potrebbe essere di notevole utilità studiare il fenotipo di animali ottenuti tramite l'incrocio tra topi "knock out" per MKP-1 e topi transgenici per Notch3-ICD che sviluppano leucemie e linfomi T, in quanto ci permetterebbe di valutare con un approccio genetico il possibile coinvolgimento di questa fosfatasi nel processo di leucemogenesi.

Inoltre, alla luce dei nostri risultati e di alcune recenti pubblicazioni¹³⁰⁻¹³³ che dimostrano la maggiore efficacia delle normali terapie quando associate al trattamento con inibitori delle γ -secretasi, l'ambito di studio che prende in considerazione l'espressione di MKP-1 e la risposta alla terapia nelle T-ALL (ma non solo) risulta essere di notevole attualità e di potenziale importanza terapeutica.

In conclusione, il presente lavoro dimostra un nuovo meccanismo d'azione di Notch3 in cellule di T-ALL. Un meccanismo che si basa sulla stabilizzazione della proteina MKP-1, una fosfatasi in grado di regolare l'attività delle MAPKs e di influenzare la risposta apoptotica di queste cellule sia nei confronti di stimoli generici che farmacologici. Nello specifico inoltre, i nostri risultati dimostrano come l'asse Dll4/Notch3/MKP-1 giochi un ruolo nelle prime fasi di crescita tumorale nel nostro modello, permettendo così di ampliare le nostre conoscenze sulla cascata di eventi che stanno a valle dell'attivazione di questo recettore.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Asnafi, V. et al. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood* **101**, 2693-703 (2003).
2. Asnafi, V. et al. Impact of TCR status and genotype on outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a LALA-94 study. *Blood* **105**, 3072-8 (2005).
3. Aifantis, I., Raetz, E. & Buonamici, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* **8**, 380-90 (2008).
4. Weng, A.P. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269-71 (2004).
5. Ellisen, L.W. et al. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649-61 (1991).
6. Sanchez-Irizarry, C. et al. Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol Cell Biol* **24**, 9265-73 (2004).
7. Barrick, D. & Kopan, R. The Notch transcription activation complex makes its move. *Cell* **124**, 883-5 (2006).
8. Oberg, C. et al. The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* **276**, 35847-53 (2001).
9. Shimizu, K. et al. Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 775-9 (2002).
10. Thurston, G., Noguera-Troise, I. & Yancopoulos, G.D. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* **7**, 327-31 (2007).
11. Zuniga-Pflucker, J.C. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* **4**, 67-72 (2004).
12. Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J. & MacDonald, H.R. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**, 247-53 (2004).
13. Sambandam, A. et al. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* **6**, 663-70 (2005).
14. Rothenberg, E.V. Notchless T cell maturation? *Nat Immunol* **2**, 189-90 (2001).
15. Schnell, S., Demolliere, C., van den Berk, P., Kirberg, J. & Jacobs, H. Constitutive expression of the pre-TCR enables development of mature T cells. *Int Immunol* **18**, 911-20 (2006).
16. Spits, H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* **2**, 760-72 (2002).
17. Ciofani, M. et al. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* **172**, 5230-9 (2004).
18. Ciofani, M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol* **6**, 881-8 (2005).
19. Hozumi, K. et al. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* **205**, 2507-13 (2008).
20. Weerkamp, F., van Dongen, J.J. & Staal, F.J. Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **20**, 1197-205 (2006).

21. Ronchini, C. & Capobianco, A.J. Notch(ic)-ER chimeras display hormone-dependent transformation, nuclear accumulation, phosphorylation and CBF1 activation. *Oncogene* **19**, 3914-24 (2000).
22. Dohda, T. et al. Notch signaling induces SKP2 expression and promotes reduction of p27Kip1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Exp Cell Res* **313**, 3141-52 (2007).
23. Satoh, Y. et al. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* **279**, 24986-93 (2004).
24. Sharma, V.M. et al. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol* **26**, 8022-31 (2006).
25. Weng, A.P. et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* **20**, 2096-109 (2006).
26. Beverly, L.J., Felsher, D.W. & Capobianco, A.J. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res* **65**, 7159-68 (2005).
27. Allman, D. et al. Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* **194**, 99-106 (2001).
28. Pear, W.S. et al. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* **183**, 2283-91 (1996).
29. Bellavia, D. et al. Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *Embo J* **19**, 3337-48 (2000).
30. Malecki, M.J. et al. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* **26**, 4642-51 (2006).
31. Thompson, B.J. et al. Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. *J Exp Med* **205**, 1395-408 (2008).
32. Bellavia, D. et al. Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3788-93 (2002).
33. Gallahan, D. et al. Expression of a truncated Int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. *Cancer Res* **56**, 1775-85 (1996).
34. Weijzen, S. et al. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* **8**, 979-86 (2002).
35. Reedijk, M. et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* **65**, 8530-7 (2005).
36. Stylianou, S., Clarke, R.B. & Brennan, K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res* **66**, 1517-25 (2006).
37. Fan, X. et al. Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* **64**, 7787-93 (2004).
38. Hallahan, A.R. et al. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Res* **64**, 7794-800 (2004).
39. Balint, K. et al. Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J Clin Invest* **115**, 3166-76 (2005).
40. Hoek, K. et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* **64**, 5270-82 (2004).

41. Nickoloff, B.J. et al. Notch and NOXA-related pathways in melanoma cells. *J Invest Dermatol Symp Proc* **10**, 95-104 (2005).
42. Fernandez-Majada, V. et al. Nuclear IKK activity leads to dysregulated notch-dependent gene expression in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 276-81 (2007).
43. Hingorani, S.R. et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437-50 (2003).
44. Kimura, K. et al. Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Sci* **98**, 155-62 (2007).
45. Iso, T., Hamamori, Y. & Kedes, L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 543-53 (2003).
46. Li, J.L. & Harris, A.L. Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis. *Cancer Cell* **8**, 1-3 (2005).
47. Gale, N.W. et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15949-54 (2004).
48. Uyttendaele, H., Ho, J., Rossant, J. & Kitajewski, J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5643-8 (2001).
49. Mailhos, C. et al. Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* **69**, 135-44 (2001).
50. Hellstrom, M. et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-80 (2007).
51. Leslie, J.D. et al. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* **134**, 839-44 (2007).
52. Lobov, I.B. et al. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3219-24 (2007).
53. Noguera-Troise, I. et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* **444**, 1032-7 (2006).
54. Ridgway, J. et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* **444**, 1083-7 (2006).
55. Suchting, S. et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3225-30 (2007).
56. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
57. Demicheli, R. Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. *Semin Cancer Biol* **11**, 297-306 (2001).
58. Demicheli, R., Terenziani, M. & Bonadonna, G. Estimate of tumor growth time for breast cancer local recurrences: rapid growth after wake-up? *Breast Cancer Res Treat* **51**, 133-7 (1998).
59. Karrison, T.G., Ferguson, D.J. & Meier, P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* **91**, 80-5 (1999).
60. Streit, M. & Detmar, M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* **22**, 3172-9 (2003).
61. Riethmuller, G. & Klein, C.A. Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse: clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients. *Semin Cancer Biol* **11**, 307-11 (2001).

62. Folkman, J. & Kalluri, R. Cancer without disease. *Nature* **427**, 787 (2004).
63. Peterson, E.W., McPhaul, J.J., Jr. & McIntosh, D.A. Serial histologic alterations in human renal homotransplants. *Am J Clin Pathol* **45**, 521-32 (1966).
64. Pantel, K., Cote, R.J. & Fodstad, O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1113-24 (1999).
65. Pantel, K. & Otte, M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin Cancer Biol* **11**, 327-37 (2001).
66. Naumov, G.N., MacDonald, I.C., Chambers, A.F. & Groom, A.C. Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? *Semin Cancer Biol* **11**, 271-6 (2001).
67. Naumov, G.N., Akslen, L.A. & Folkman, J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* **5**, 1779-87 (2006).
68. Aguirre-Ghiso, J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **7**, 834-46 (2007).
69. Johnson, G.L. & Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-2 (2002).
70. Engelberg, D. Stress-activated protein kinases-tumor suppressors or tumor initiators? *Semin Cancer Biol* **14**, 271-82 (2004).
71. Keyse, S.M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 186-92 (2000).
72. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40 (2001).
73. Seger, R. & Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* **9**, 726-35 (1995).
74. Zhou, J.Y., Liu, Y. & Wu, G.S. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in oxidative damage-induced cell death. *Cancer Res* **66**, 4888-94 (2006).
75. Wang, Z., Xu, J., Zhou, J.Y., Liu, Y. & Wu, G.S. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res* **66**, 8870-7 (2006).
76. Cowan, K.J. & Storey, K.B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* **206**, 1107-15 (2003).
77. Olson, J.M. & Hallahan, A.R. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med* **10**, 125-9 (2004).
78. Lee, J.C. et al. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* **47**, 185-201 (2000).
79. Rennefahrt, U., Janakiraman, M., Ollinger, R. & Troppmair, J. Stress kinase signaling in cancer: fact or fiction? *Cancer Lett* **217**, 1-9 (2005).
80. Timofeev, O., Lee, T.Y. & Bulavin, D.V. A subtle change in p38 MAPK activity is sufficient to suppress in vivo tumorigenesis. *Cell Cycle* **4**, 118-20 (2005).
81. Wu, G.S. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther* **3**, 156-61 (2004).
82. Ranganathan, A.C., Adam, A.P. & Aguirre-Ghiso, J.A. Opposing roles of mitogenic and stress signaling pathways in the induction of cancer dormancy. *Cell Cycle* **5**, 1799-807 (2006).

83. Aguirre Ghiso, J.A., Kovalski, K. & Ossowski, L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol* **147**, 89-104 (1999).
84. Aguirre-Ghiso, J.A., Liu, D., Mignatti, A., Kovalski, K. & Ossowski, L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell* **12**, 863-79 (2001).
85. Aguirre-Ghiso, J.A., Estrada, Y., Liu, D. & Ossowski, L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* **63**, 1684-95 (2003).
86. Ranganathan, A.C., Zhang, L., Adam, A.P. & Aguirre-Ghiso, J.A. Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res* **66**, 1702-11 (2006).
87. Camps, M., Nichols, A. & Arkinstall, S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J* **14**, 6-16 (2000).
88. Keyse, S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 253-61 (2008).
89. Farooq, A. & Zhou, M.M. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* **16**, 769-79 (2004).
90. Wu, J.J., Zhang, L. & Bennett, A.M. The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* **25**, 4792-803 (2005).
91. Boutros, T., Chevet, E. & Metrakos, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* **60**, 261-310 (2008).
92. Charles, C.H., Abler, A.S. & Lau, L.F. cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene* **7**, 187-90 (1992).
93. Noguchi, T. et al. Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth. *Mol Cell Biol* **13**, 5195-205 (1993).
94. Brondello, J.M., Pouyssegur, J. & McKenzie, F.R. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* **286**, 2514-7 (1999).
95. Lin, Y.W., Chuang, S.M. & Yang, J.L. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **278**, 21534-41 (2003).
96. Lin, Y.W. & Yang, J.L. Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *J Biol Chem* **281**, 915-26 (2006).
97. Yaglom, J., O'Callaghan-Sunol, C., Gabai, V. & Sherman, M.Y. Inactivation of dual-specificity phosphatases is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinases by heat shock and hsp72. *Mol Cell Biol* **23**, 3813-24 (2003).
98. Kassel, O. et al. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J* **20**, 7108-16 (2001).
99. Salojin, K.V. et al. Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *J Immunol* **176**, 1899-907 (2006).

100. Zhao, Q. et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med* **203**, 131-40 (2006).
101. Loda, M. et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* **149**, 1553-64 (1996).
102. Zhang, L. et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* **276**, 1268-72 (1997).
103. Emslie, E.A., Jones, T.A., Sheer, D. & Keyse, S.M. The CL100 gene, which encodes a dual specificity (Tyr/Thr) MAP kinase phosphatase, is highly conserved and maps to human chromosome 5q34. *Hum Genet* **93**, 513-6 (1994).
104. Li, M., Zhou, J.Y., Ge, Y., Matherly, L.H. & Wu, G.S. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **278**, 41059-68 (2003).
105. Keyse, S.M. & Emslie, E.A. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* **359**, 644-7 (1992).
106. Laderoute, K.R. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments. A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase activity. *J Biol Chem* **274**, 12890-7 (1999).
107. Magi-Galluzzi, C. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Lab Invest* **76**, 37-51 (1997).
108. Magi-Galluzzi, C., Montironi, R., Cangi, M.G., Wishnow, K. & Loda, M. Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN. *Virchows Arch* **432**, 407-13 (1998).
109. Srikanth, S., Franklin, C.C., Duke, R.C. & Kraft, R.S. Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. *Mol Cell Biochem* **199**, 169-78 (1999).
110. Denkert, C. et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* **102**, 507-13 (2002).
111. Wang, H.Y., Cheng, Z. & Malbon, C.C. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Lett* **191**, 229-37 (2003).
112. Small, G.W., Shi, Y.Y., Higgins, L.S. & Orlowski, R.Z. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res* **67**, 4459-66 (2007).
113. Wu, J.J. & Bennett, A.M. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem* **280**, 16461-6 (2005).
114. Small, G.W. et al. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol* **66**, 1478-90 (2004).
115. Lomonaco, S.L. et al. Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues induces sustained activation of Erk1/2 via down-regulation of MKP-1: role in the apoptotic effect of etoposide. *J Biol Chem* **283**, 17731-9 (2008).

116. Wang, Z. et al. High level of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression is associated with cisplatin resistance in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* **51**, 754-9 (2008).
117. Wang, J., Zhou, J.Y. & Wu, G.S. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* **67**, 11933-41 (2007).
118. Chattopadhyay, S. et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **25**, 3335-45 (2006).
119. Sanchez-Perez, I., Martinez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S.M. & Perona, R. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* **19**, 5142-52 (2000).
120. Indraccolo, S. et al. Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4216-21 (2006).
121. Haruki, N. et al. Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res* **65**, 3555-61 (2005).
122. Kondoh, K., Sunadome, K. & Nishida, E. Notch signaling suppresses p38 MAPK activity via induction of MKP-1 in myogenesis. *J Biol Chem* **282**, 3058-65 (2007).
123. Liu, W.H., Hsiao, H.W., Tsou, W.I. & Lai, M.Z. Notch inhibits apoptosis by direct interference with XIAP ubiquitination and degradation. *Embo J* **26**, 1660-9 (2007).
124. Dufraigne, J., Funahashi, Y. & Kitajewski, J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* **27**, 5132-7 (2008).
125. Lu, J., Quearry, B. & Harada, H. p38-MAP kinase activation followed by BIM induction is essential for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *FEBS Lett* **580**, 3539-44 (2006).
126. Li, J. et al. Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Mol Cell Biol* **21**, 8213-24 (2001).
127. Wong, H.R., Dunsmore, K.E., Page, K. & Shanley, T.P. Heat shock-mediated regulation of MKP-1. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C1152-8 (2005).
128. Hutter, D., Chen, P., Barnes, J. & Liu, Y. Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation. *Biochem J* **352 Pt 1**, 155-63 (2000).
129. Nie, L., Wu, H. & Sun, X.H. Ubiquitination and degradation of Tal1/SCL are induced by notch signaling and depend on Skp2 and CHIP. *J Biol Chem* **283**, 684-92 (2008).
130. Akiyoshi, T. et al. Gamma-secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Gastroenterology* **134**, 131-44 (2008).
131. Liu, S., Breit, S., Danckwardt, S., Muckenthaler, M.U. & Kulozik, A.E. Downregulation of Notch signaling by gamma-secretase inhibition can abrogate chemotherapy-induced apoptosis in T-ALL cell lines. *Ann Hematol* (2008).
132. Meng, R.D. et al. gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer Res* **69**, 573-82 (2009).
133. Real, P.J. et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **15**, 50-8 (2009).

{Indraccolo, 2009 in pubblicazione}

Indraccolo S. et al. Crosstalk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy. Accepted for publication on *Cancer Res.*

Ringrazio tutti i miei colleghi del lab perché è grazie anche a voi se questo lavoro esiste ma soprattutto perché siete degli amici e mi avete aiutato a crescere come ricercatore e soprattutto come persona.....ovunque lavorerò voi sarete sempre con me!

Ringrazio i miei tre capi, il Prof. Amadori, il Dott. Indraccolo e la Dott.ssa Zamarchi. Perché oltre a sopportarmi ed a darmi l'opportunità di lavorare per loro per tutto questo tempo, mi hanno insegnato a conoscere, ognuno a modo suo, questo fantastico mondo che è la ricerca.

Ringrazio te, che sei lontana, ma che sei comunque ispirazione e gioia, la più grande scoperta che abbia fatto.

Ringrazio la mia Famiglia, perché è sempre pronta a proteggermi, spronarmi ed incoraggiarmi. Perché hanno fiducia in me e non li deluderò.

Max