



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: SCIENZE GERIATRICHE ED EMATOLOGICHE

XXIV CICLO

## *FOSFO-TIROSIN-FOSFATASI (PTP<sub>s</sub>): TRASDUTTORI POSITIVI E NEGATIVI DELLE VIE DEL SEGNALE MEDIATE DA RECETTORI DI MEMBRANA*

DIRETTORE DELLA SCUOLA: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

COORDINATORE DI INDIRIZZO: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

SUPERVISORE: Ch.mo Prof.ssa Annamaria Brunati

DOTTORANDA: Dr.ssa Elisa Magrin

31 gennaio 2012



# Indice

Indice	1
Sommario	3
Abstract	5
Elenco delle abbreviazioni	7
Abbreviazioni degli aminoacidi	7
Definizione delle abbreviazioni	8
Tirosin Chinasi della famiglia Src	9
<i>Introduzione</i>	11
1. Fosforilazione proteica	13
1.1 Introduzione	13
1.2 Fosforilazione tirosinica	13
1.3 Protein tirosin chinasi (PTKs)	14
1.3.1 Tirosin chinasi recettoriali (RTKs)	14
1.3.2 Tirosin chinasi non recettoriali (nRTKs)	15
2 Struttura e funzione delle tirosin chinasi della famiglia Src	15
2.1 Basi strutturali della regolazione dell'attività delle tirosin-chinasi della famiglia Src	19
2.2 Meccanismi di attivazione delle SFKs	21
3 Struttura e funzione delle tirosin chinasi della famiglia Janus	25
4 Protein fosfatasi	27
4.1 La superfamiglia delle protein tirosin fosfatasi	28
4.1.1 La struttura delle tirosin fosfatasi SHP-1 e SHP-2	30
4.1.2 La struttura della tirosin fosfatasi PTP1B	33
<i>Obiettivi generali</i>	37
<i>Materiali e metodi</i>	41
1 Materiali	43
2 Metodi	44
2.1 Metodi comuni alle tre parti di tesi	44
2.2. Metodi relativi alla prima e seconda parte di tesi	46
2.3. Metodi relativi alla terza parte di tesi	49

<i>Prima parte</i>	53
1 I disordini mieloproliferativi	55
1.1 Classificazione e caratteristiche generali	55
1.2 La mutazione di JAK2 <sup>V617F</sup> nella PV e nella ET	58
2 Le piastrine	61
2.1 Morfologia e funzioni delle piastrine	61
2.2. Formazione del tappo emostatico: attivazione e aggregazione piastrinica	64
2.3 Attivazione piastrinica indotta da trombina	68
2.4 Attivazione piastrinica indotta da trombopoietina	69
2.5 Anomalie piastriniche nei MPDs	69
3 Obiettivi	71
4 Risultati	72
5 Discussione	87
<i>Seconda parte</i>	91
1 Piastrine e immunità innata	93
1.1 I recettori Fcγ	93
1.2 FcγRIIA (CD32) nelle piastrine	96
2 La trombocitopenia indotta da eparina (HIT)	97
2.1 Patogenesi	99
2.2 Sintomi e manifestazioni cliniche	101
2.3 Polimorfismo di FcγRIIA e HIT	102
3 Obiettivi	103
4 Risultati	104
<i>Terza parte</i>	117
1 Fibrosi epatica	119
2 Cellule stellate	120
3 La citochina PDGF	123
4 Obiettivi	124
5. Risultati	125
6 Discussione	134
<i>Bibliografia</i>	137

## Sommario

La fosforilazione tirosinica di proteine degli organismi eucarioti è il meccanismo chiave di trasduzione del segnale indotto da stimoli ambientali a livello cellulare, e si esplica in eventi di proliferazione, differenziazione, morte cellulare e sopravvivenza. Questo processo è mediato dall'azione concertata di protein tirosin chinasi (PTKs), che trasferiscono un gruppo fosfato alle proteine bersaglio, e protein tirosin fosfatasi (PTPs), che lo rimuovono; entrambe le classi di questi enzimi possono prender parte ad eventi attivatori e inibitori del signalling. La fosforilazione in tirosina determina il coinvolgimento anche del dominio SH2 (Src-homology 2 domain), presente in numerose proteine con svariate funzioni, che coordina l'interazione proteina-proteina proprio grazie ai residui tirosinici fosforilati, prendendo quindi parte alla modulazione del segnale di trasduzione.

Il sistema formato da PTKs, PTPs e dominio SH2 è noto come “*writer*” (PTK), “*eraser*” (PTP) e “*reader*”(SH2) *tollkit*, denominazione che vuole sottolineare come la relazione e la combinazione di questi tre elementi riesca a determinare una fine e complessa regolazione a livello di signalling.

Questo lavoro di tesi intende esaminare il coinvolgimento della fosforilazione tirosinica nel mediare le risposte cellulari a diversi stimoli extracellulari e valutare quali sono i fattori responsabili della sua alterazione in determinate situazioni patologiche ed in particolare il ruolo delle PTPs non recettoriali in tre specifiche patologie.

In Policitemia Vera (PV) e Trombocitemia Essenziale (ET), disordini mieloproliferativi Philadelphia-negative (Ph-MPDs), i nostri dati dimostrano che la mancata fosforilazione del sito inibitorio, Y527, della tirosin chinasi Src in piastrine non stimolate è dovuto alla costitutiva attivazione di SHP-2, una PTP non recettoriale, determinando una forma pre-attivata di Src. Questa forma di Src è implicata nella ipersensibilizzazione piastrinica ed è responsabile, almeno parzialmente, delle funzionalità anormali delle piastrine di PV e ET.

Nella Trombocitopenia Indotta da Eparina (HIT), reazione autoimmune che porta all'attivazione del recettore Fc $\gamma$ RIIA piastrinico, pur non avendo evidenziato una

correlazione tra il polimorfismo del recettore e HIT, noi abbiamo indagato il diverso stato di fosforilazione della sequenza ITAM di Fc $\gamma$ RIIA e conseguente risposta piastrinica in relazione al tipo di ligando. Stimolando infatti le piastrine di donatori con l'anticorpo monoclonale IV.3, noto per essere un inibitore di Fc $\gamma$ RIIA, e con delle IgG complessate, non abbiamo evidenziato fosforilazione dell'ITAM del recettore nè aggregazione, anche se le piastrine vanno incontro ad un cambiamento di forma. In presenza però dell'inibitore di PTP1B, la fosfatasi più abbondante in questo tipo di cellule, gli stessi stimoli portano alla fosforilazione di ITAM e le piastrine vanno incontro ad aggregazione. Questo meccanismo potrebbe essere implicato nel ruolo svolto dalle piastrine nella clearance dei complessi contenenti IgG presenti in circolo.

Infine noi abbiamo dimostrato per la prima volta che la risposta proliferativa dopo stimolazione di PDGF (platelet-derived growth factor) delle cellule stellate epatiche (HSCs), principali cellule coinvolte nella fibrosi epatica, è mediata dalle fosfatasi SHP-2 e SHP-1: SHP-2 partecipa come trasduttore positivo del segnale mediato da PDGF, mentre SHP-1 ha effetto negativo sul segnale mediato da PDGF catalizzando la defosforilazione del recettore di PDGF. L'alterazione della loro attività e/o espressione porta ad una inibizione della proliferazione cellulare di HSCs, perciò entrambe le fosfatasi si propongono come possibili bersagli di potenziali farmaci antifibrotici.

In tutti i modelli patologici studiati, è chiaro che le PTPs rivestono un ruolo fondamentale nel signaling cellulare; la loro presenza non solo non ha significato esclusivamente negativo ma è necessaria per organizzare la risposta a diversi tipi di stimolo. Lo studio della regolazione del signaling indotto dalle PTPs potrebbe quindi aprire strade alternative per individuare nuove terapie farmacologiche.

## Abstract

The tyrosine phosphorylation in eukaryotic proteins is a key event for transducing environmental cues into cellular responses ranging from cell-to-cell communication to proliferation, differentiation, cell death and survival. This mechanism of signal transduction is mediated by the opposing and concerted action of Protein Tyrosin Kinases (PTKs), which add phosphoryl groups to target proteins, and Protein Tyrosin Phosphatases (PTPs), which remove them; both classes of enzymes can take part in activatory and inhibitory signalling processes. Tyrosin phosphorylation calls also into action the Src-homology 2 domain (SH2), which is contained in a myriad of proteins with varied functions and that directs protein-protein interaction by “sensing” the phosphorylated state of tyrosine residues, taking part in the modulation of signal transduction. This three-part system has recently been baptized as the “*writer*” (PTK), “*eraser*” (PTP) and “*reader*” (SH2) *tollkit*, emphasizing how the combination and dynamic interplay of the elements can generate diverse and complex regulatory outputs.

The aim of this work was to determine how the tyrosine phosphorylation is involved in the cellular response to extracellular signals; we investigated the events which trigger an altered pathway in diseases, mainly the role of non-receptor PTPs in three different pathological conditions.

In Polycytemia Vera (PV) and Essential Thrombocythemia (ET), which are Philadelphia-negative myeloproliferative disorders (Ph-MPDs), our results demonstrate that in resting platelets the dephosphorylation of the Src-Tyr527 is due the SHP-2 constitutive activity, a non-receptor PTPs, leading to the Src preactivation. The anomalous activation of the kinase is implicated in the hypersensitivity of Ph-MPDs and likely involved in the functional abnormalities of PV and ET platelets.

In Heparin-Induced-Thrombocytopenia (HIT), immunological reaction that lead to the activation of Fc $\gamma$ RIIA in platelets, we have not identified any correlation between the polymorphisms of receptor and HIT, but our results demonstrate that the phosphorylation of Fc $\gamma$ RIIA-ITAM motif is due the type of ligand and that influences the responses in the platelets. We stimulated normal platelets with

either IV.3, functional blocking antibody against Fc $\gamma$ R1IA, or complexes of IgG molecules, and we have not highlighted phosphorylation of the ITAM or aggregation, but we observed a mildly shape change. Interestingly, the pre-incubation of the platelets with PTP-1B, the largest PTPs in platelets, in association with IV.3 and IgG as agonists, leads to phosphorylation of the ITAM and to aggregation. This mechanism may be involved in the clearance of IgG-containing complexes from the circulation by platelets.

Finally, we demonstrate for the first time that the PDGF (platelet-derived growth factor)-induced proliferation in hepatic stellate cells (HSCs), primary effector cells in liver fibrosis, is mediated by the PTPs SHP-2 and SHP-1: SHP-2 acts as positive regulator of PDGF-dependent signalling, whereas SHP-1 is a negative regulator and lead to the dephosphorylation of the PDGF-receptor. An altered activity and/or expression of these two PTPs causes an inhibited cell proliferation of HSCs, thus they may be a target for new antifibrotic therapies for patients with liver fibrosis.

The three pathological models analyzed in this work highlight the key role of PTPs in signalling pathways; they are not to be trivially dismissed as negative regulators because they can organize cellular responses to different stimulations. Further studies on PTPs-induced signalling regulation may identify new pharmacological therapies.



## **Elenco delle abbreviazioni**

### *Abbreviazioni degli aminoacidi*

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

## *Definizione delle abbreviazioni*

BrdU = 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA = Albumina di siero bovino

Cdc2 = Cell division cycle 2

cpm = conte per minuto

C-terminale = Carbossi-terminale

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA = Acido etilen-diammino-tetracetico

EGTA = Acido etilen-glicol-bis(2-aminoetiletere) NNN'N'tetracetico

FcγRs = recettori per la regione Fc delle immunoglobuline G (IgG)

GBSS = Gey's Balanced Salt Solution

HSC = Hepatic Stellate Cell

Ig = Immunoglobulin

JAK = Janus Kinase

MPDs = disordini mieloproliferativi

N-RTK = tirosin chinasi non recettoriale

PAGE = Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS = soluzione di fosfati tamponati

PMSF = fluoruro di fenilmetansulfonile

PTPs = protein tirosin fosfatasi

RTK = tirosin chinasi recettoriale

SDS = Sodio Dodecil Solfato

SFKs = Src Family Kinases

SH2 = Src homology 2 domain

TRIS = Tris-(idrossimetil)-aminometano

TRITC = Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate

Wb = Western blot

[ $\gamma$ <sup>33</sup>P]ATP = ATP marcato con fosforo radioattivo in posizione  $\gamma$

### ***Tirosin Chinasi della famiglia Src***

Blk = B-lymphoid tyrosine kinase

Fgr = Gardner-Richter feline sarcoma

Fyn = Oncogene related to Src, Fgr, Yes

Hck = Hemopoietic cell kinase

Lck = Lymphocyte specific protein tyrosine kinase

Lyn = Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog

Src = Rous sarcoma

Yes = Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1

Yrk = Tyrosine phosphorylation regulated kinase



# *Introduzione*



## ***1. Fosforilazione proteica***

### **1.1 Introduzione**

La fosforilazione reversibile di specifici residui aminoacidici è un meccanismo ubiquitario presente sia negli eucarioti che nei procarioti, che sta alla base di numerosi processi come crescita, differenziamento, espressione genica, metabolismo, traffico cellulare e apoptosi. Le protein chinasi sono enzimi con attività fosfotransferasica appartenenti ad una grande famiglia di molecole, che assieme alle protein fosfatasi hanno la responsabilità di regolare, in pratica, ogni tipo di funzione cellulare (Pinna L.A. and Ruzzene M., 1996). Questi enzimi usano il gruppo fosfato in posizione  $\gamma$  dell'ATP (o del GTP) per generare monoesteri fosforici; gli accettori di fosfato possono essere i gruppi alcolici di proteine (in serina o treonina) o fenolici (in tirosina) (Hanks S.K. and Hunter T., 1995). Negli eucarioti, il dominio della protein chinasi responsabile della fosforilazione dei residui di serina, treonina o tirosina rappresenta il primo, il secondo e il terzo dominio più comune nella sequenza del genoma rispettivamente di lieviti, verme e mosca; ciò dimostra come il signaling mediato da eventi fosforilativi sia di estrema importanza in questi organismi (Johnson L.N. and Lewis R.J., 2001). Nell'uomo, lo stesso dominio è il terzo più rappresentato dell'intero genoma e le chinasi codificate sono 518 (Cowan-Jacob S.W., 2006). Quasi tutte le via di signaling intracellulari, dunque, usano la fosforilazione proteica per mediare segnali.

### **1.2 Fosforilazione tirosinica**

La fosforilazione tirosinica reversibile nelle proteine degli organismi eucarioti è un meccanismo chiave di trasduzione del segnale indotto da stimoli ambientali a livello cellulare, e si esplica in eventi quali proliferazione, differenziazione, morte cellulare e sopravvivenza (Hunter T., 2009). Oltre all'azione concertata di protein tirosin chinasi (PTKs), e protein tirosin fosfatasi (PTPs), (Hubbard S.R. and Till J.H., 2000; Nell B.G. and Tonks N.K., 1997), questo processo determina il coinvolgimento del dominio SH2 (Src homology 2 domain), presente in numerose proteine con svariate funzioni e che coordina l'interazione proteina-proteina

proprio grazie ai residui tirosinici fosforilati, prendendo quindi parte alla modulazione del segnale di trasduzione (Pawson T. et al., 2001).

Questo sistema PTK - PTP - SH2 è noto come “*writer*” (PTK), “*eraser*” (PTP) e “*reader*” (SH2) *tollkit* (figura 1), denominazione che vuole sottolineare come la relazione e la combinazione di questi tre elementi riesca a determinare una fine e complessa regolazione a livello di signalling (Lim W.A. and Pawon T., 2010).

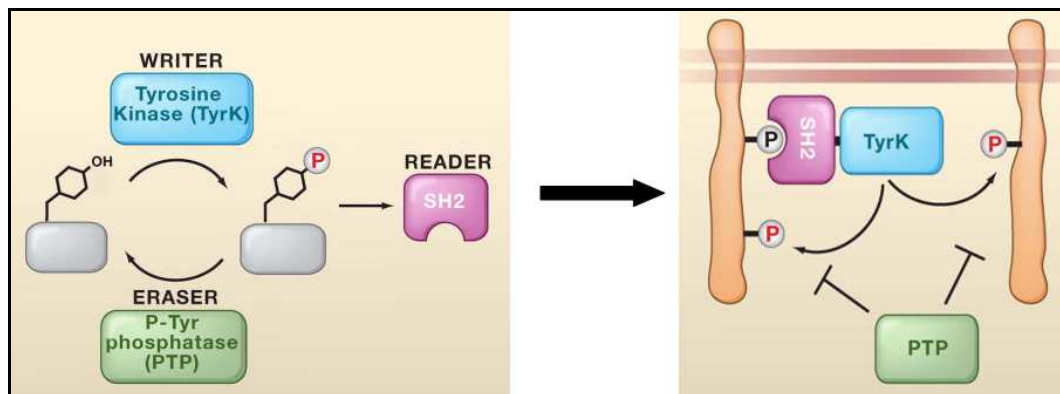


Figura 1: “Writer - eraser - reader tollkit” (Cell. 2010 Sep 3;142(5):661-7.)

### 1.3 Protein tirosin chinasi (PTKs)

Le PTKs rappresentano il 10-15% delle protein chinasi totali nei metazoi: in C.elegans esse sono 90 su 454 protein chinasi totali, mentre nell’uomo 90 protein chinasi su 525 sono PTKs. Basandosi sull’omologia di sequenza, le PTKs rappresentano il più grande gruppo di protein chinasi identificato e comprendono circa 100 membri.

Le PTKs possono essere ulteriormente suddivise in due gruppi: le tirosin chinasi recettoriali (RTKs) e le tirosin chinasi non recettoriali (nRTKs).

#### 1.3.1 Tirosin chinasi recettoriali (RTKs)

Le RTKs sono recettori di membrana con attività tirosin chinasica e sono costituite da un dominio extracellulare per l’interazione con il ligando, una sequenza trans-membrana ed un dominio chinasico intracellulare. L’interazione del ligando con la porzione extracellulare del recettore determina la dimerizzazione dello stesso. Tale evento promuove l’attivazione della chinasi



mediante autofosforilazione del dominio catalitico intracellulare permettendo la trasduzione del segnale all'interno della cellula.

### **1.3.2 Tirosin chinasi non recettoriali (nRTKs)**

Le nRTK sono molecole trasduttrici del segnale prive della porzione extracellulare e trans-membrana, anche se possono essere legate direttamente o indirettamente ai recettori di membrana. Le nRTKs mediano la risposta agli stimoli esterni mediante l'uso di unità modulari (domini) che hanno attività chinasi (dominio catalitico), attività regolatoria o di modulazione dell'interazione proteina-proteina, come i domini SH3 (Src Homology 3), SH2 (Src Homology 2) e PH (Pleckstrin Homology), o di localizzazione sub-cellulare determinata da modificazioni post-traduzionali quali la miristoilazione o la palmitoilazione (Manning et al., 2002).

In questo lavoro di tesi sono state studiate nello specifico Src, appartenente alla famiglia delle tirosin chinasi della famiglia Src (SFK) e JAK2, della famiglia delle tirosin chinasi non recettoriali Janus.

## ***2 Struttura e funzione delle tirosin chinasi della famiglia Src***

Nei mammiferi, le famiglie di nRTK identificate sono 10, e tra queste la più rappresentativa è quella delle tirosin chinasi della famiglia Src (Manning et al., 2002).

I primi studi sulle tirosin chinasi della famiglia Src (SFKs) risalgono al lontano 1911 quando, nel corso dei suoi esperimenti, Peyton Rous focalizzò la sua attenzione sull'attività trasformante del Rous sarcoma virus (Rous P.A., 1911). Questa attività venne in seguito attribuita al gene v-Src ed in particolare alla proteina virale codificata v-Src, denominata anche pp60v-Src e nota come la prima tirosin chinasi Src identificata (Brugge J.S. and Erikson R.L., 1977). Successivamente Stehelin ed i suoi collaboratori determinarono l'esistenza di un gene c-Src fisiologicamente presente in cellule non trasformate, individuando di fatto il primo proto-oncogene (Stehelin D. et al., 1976).

La famiglia delle tirosin-chinasi della famiglia Src consiste di nove membri così elencati: Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes and Yrk. Mentre Src, Fyn, Yes e

Yrk sono ubiquitariamente espressi; Hck, Lyn, Lck, Fgr e Blk si trovano quasi esclusivamente nelle cellule di origine ematopoietica (Brown M. and Cooper J.A., 1996).

Le SFK svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi cellulare, in particolare nella progressione del ciclo cellulare, nella proliferazione, nella formazione di adesioni focali, nella migrazione, nell'apoptosi, nel differenziamento e nella trascrizione genica. Esse si localizzano principalmente sul lato citoplasmatico della membrana, dove rivestono un ruolo chiave nelle vie di trasduzione del segnale; possono inoltre associarsi agli endosomi, alle vescicole secretorie, ai mitocondri, all'apparato del Golgi e alla membrana perinucleare (Tibaldi E. et al., 2008; Brunati AM et al., 2005).

Le tirosin chinasi Src sono considerate dei prototipi modello di proteine modulari del segnale, come mostrato in figura 2 (Boggon T.J. and Eck M.J., 2004; Roskoski R.J., 2004).



**Figura 2: Domini strutturali della tirosin-chinasi c-Src** (*Biochim Biophys Acta*, 2002. 602: 114-130)

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

- un dominio SH4 (Src Homology 4) che comprende i primi 16 residui aminoacidici ed è responsabile dell'interazione delle SFK alle membrane cellulari. Le SFK si ancorano infatti alla membrana grazie all'acilazione specifica di due residui aminoacidici presenti nella sequenza consenso Met-Gly-Cys della regione N-terminale; tutte le tirosin-chinasi Src sono miristoilate a livello della Gly in posizione +2. Benchè questa reazione sia irreversibile, si è dimostrata alcune volte insufficiente ad una corretta localizzazione delle SFK. Infatti, sette membri su nove sono palmitoilati a livello della Cys in posizione +3, altre invece utilizzano (come nel caso di c-Src) delle interazioni elettrostatiche con i lipidi di membrana promosse da

residui basici, in particolare delle lisine, presenti nella regione N-terminale (Sigal C.T. et al., 1994);

- un dominio unico diverso per tutti i membri e di cui non si conosce ancora la funzione;
- un dominio SH3 (Src Homology 3), costituito da 50-60 residui aminoacidici, che ha una funzione non catalitica in quanto media interazioni proteina-proteina intra- ed inter-molecolari, coinvolte nel controllo dell'attività enzimatica, dell'interazione con i substrati e della localizzazione sub-cellulare (figura 2). Il dominio presenta una struttura a  $\beta$  barile, con 5 foglietti antiparalleli e 2 loops denominati RT e n-Src; questi ultimi si trovano alla fine di una superficie ricca in aminoacidi aromatici ed idrofobici che delimita la regione di riconoscimento della sequenza in prolina del motivo consenso PXXP presente nella proteina partner. Quando il dominio SH3 interagisce con il motivo PXXP, questo adotta una conformazione ad elica poli-prolinica di tipo II (PPII). Per le tirosin chinasi Src esistono dei determinanti di specificità e di affinità di legame derivanti dall'orientazione della coordinazione dei residui di arginina o di lisina presenti al lato N-terminale (definendo ligandi di classe I) o al C-terminale (definendo ligandi di classe II) del core PXXP. L'interazione mediata dal dominio SH3 con la sequenza PXXP della proteina partner è a bassa affinità, tanto che variazioni della sequenza aminoacidica nel consenso possono aumentare o diminuire l'affinità di binding per il substrato (Boggon T.J. and Eck M.J. 2004 e Roskoski R.J. 2004).
- un dominio SH2 (Src Homology 2), costituito da circa 100 residui aminoacidici, che ha funzione non catalitica ma necessario in quanto modula, mediante interazione proteina-proteina, l'attività catalitica o il riconoscimento dei substrati (figura 2). Il dominio ha una struttura a foglietto  $\beta$  centrale e due singole  $\alpha$  eliche ai lati di quest'ultimo. Gli elementi di struttura secondaria e i loops che li connettono costituiscono due siti di riconoscimento del motivo consenso della proteina partner: uno per la tirosina fosforilata (pTyr) ed uno di interazione per gli aminoacidi presenti al C-terminale rispetto alla pTyr. Studi cristallografici hanno dimostrato che un residuo di arginina altamente conservato (Arg175 in c-Src) situato nella tasca di riconoscimento di pTyr è

determinante per le interazioni elettrostatiche con questa. Le SFK hanno dei determinanti di specificità nel riconoscimento della pTyr: questa infatti deve essere inclusa in una sequenza consenso pY-E-E-I, dove la isoleucina (I) in posizione +3 interagisce con il pocket idrofobico del dominio SH2 di SFK. Le interazioni polari ed elettrostatiche che stabilizzano l'interazione SH2-mediata sono favorite dalla presenza dei residui di acido glutammico (Glu) in posizione +1 e +2, anche se la sostituzione di questi non determina sostanziali variazioni nella capacità di binding (Boggon T.J. and Eck M.J. 2004 e Roskoski R.J. 2004).

- un dominio SH1 (Src Homology 1) o catalitico, costituito da circa 260 aminoacidi, che è responsabile dell'attività enzimatica. Esso presenta una caratteristica struttura bilobata comune a tutte le Ser/Thr e Tyr-chinasi, che consiste di un lobo N-terminale (o piccolo lobo) costituito da 5 foglietti  $\beta$  ed una singola  $\alpha$ -elica (chiamata anche elica C), e di un lobo C-terminale (o grande lobo), costituito prevalentemente da  $\alpha$ -eliche. Il piccolo lobo è coinvolto primariamente nell'ancoraggio e nell'orientamento dell'ATP; il legame con il nucleotide fosfato è coordinato in parte da una zona ricca in glicina detta G-loop (ma comunemente chiamata anche P-loop, dove P indica il gruppo fosfato dell'ATP). Il grande lobo è coinvolto nel legame con il substrato e contiene il sito di attivazione in cui compare la Tyr416 (in c-Src), la cui fosforilazione determina la completa attivazione dell'enzima. Nella fessura tra i due lobi si trova il sito catalitico dove avviene il trasferimento del fosfato dall'ATP al substrato (Boggon T.J. and Eck M.J., 2004). Deformazioni strutturali dei due lobi possono determinare delle variazioni dell'angolo di apertura del core catalitico tali da permettere l'accesso all'ATP al core ed il rilascio di ADP. Le diverse conformazioni assunte dai due lobi generano così una diversa accessibilità alla tasca catalitica tale da promuovere o inibire l'attività enzimatica.

Nel core catalitico si trovano diversi residui aminoacidici altamente conservati: la Lys295 implicata nella formazione di legami ionici con i fosfati  $\alpha$  e  $\beta$  dell'ATP; L'Asp386, noto anche come l'aspartato catalitico, responsabile dell'orientazione dei gruppi tirosinici del substrato ed accettore

di protoni da parte della Tyr che deve essere fosforilata, facilitando l'attacco nucleofilo del fosforo  $\gamma$  dell'ATP. Altro residuo fondamentale che si trova nel loop di attivazione del grande lobo è l'Asp404, il quale lega gli ioni  $Mg^{2+}$  che coordinano i fosfati  $\beta$  e  $\gamma$  dell'ATP (Boggon T.J. and Eck M.J. 2004; Roskoski R.J., 2004).

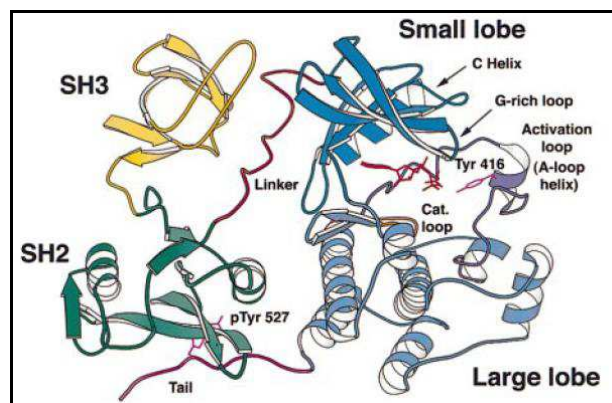
- una regione C-terminale costituita da circa 15-17 residui aminoacidici, che contiene una Tyr in posizione 527 (in c-Src) altamente conservata in tutte le SFKs (figura 2). La Tyr527 è un importante sito regolatorio in quanto la sua fosforilazione determina dei cambiamenti conformazionali dovuti all'interazione intramolecolare della pTyr527 con il dominio SH2: ciò determina una inattivazione della chinasi. La fosforilazione della Tyr527 è determinata dall'azione di due tirosin-chinasi come Csk (C-terminal Src kinase) ed il suo omologo Chk (Csk-homologous kinase) (Chong Y.P. et al., 2005). In condizioni basali in vivo, il 90-95% di Src è fosforilata in Tyr527. L'importanza della fosforilazione della Tyr527 nel meccanismo di inibizione dell'attività chinasi di c-Src è suggerita da evidenze sperimentali in cui i mutanti di c-Src Tyr527Phe (in cui la tirosina è sostituita con una fenilalanina) presentano una costitutiva attività basale associata alla comparsa di trasformazioni cellulari anche di natura cancerogena (Kmieciak T.E. and Shalloway D., 1987).

## **2.1 Basi strutturali della regolazione dell'attività delle tirosin-chinasi della famiglia Src**

Uno dei più importanti meccanismi di regolazione delle SFK è lo stato di fosforilazione di due residui aminoacidici chiave: la  $Y_A$  o  $Y_{416}$  nel loop di attivazione e la  $Y_T$  o  $Y_{527}$  nella coda C-terminale. La struttura cristallizzata della forma fosforilata p $Y_T$  di c-Src e Hck, permette di capire che la conformazione inattiva della chinasi è determinata dalle interazioni intramolecolari mediate dai suoi domini regolatori SH2 e SH3 (Xu W. et al., 1997 e Sicheri F. et al., 1997). Mentre il dominio SH2 lega la p $Y_T$  della coda C-terminale, il dominio SH3 interagisce con il segmento linker tra il dominio SH2 ed il dominio catalitico (chiamato anche SH2-kinase linker). Queste modificazioni conformazionali permettono da un lato al dominio SH2 di avvicinarsi al grande lobo, dall'altro al

dominio SH3 di accostarsi al piccolo lobo. L'analisi delle sequenze aminoacidiche coordinate dai due domini ha dimostrato che essi sono dei siti di legame a bassa affinità; infatti, l'SH2-kinase linker non presenta una classica sequenza consenso PXXP, pur assumendo una struttura ad elica PPII in associazione al dominio SH3. Inoltre in posizione pY+3 della pY<sub>T</sub> è presente una glicina invece di una isoleucina, come si verifica nella sequenza consenso preferenziale. Le posizioni così assunte dai due domini non occludono stericamente la tasca catalitica ma determinano delle distorsioni del sito attivo tali da renderlo inattivo (Figura 3).

L'interazione mediata dal dominio SH3 permette al Trp260 dell' "SH2-kinase linker" di inserirsi nella tasca idrofobica definita dalla Leu308 e dall'Ala311 dell' $\alpha$ -elica C e dalla Leu325 e dalla Val328 del  $\beta$ -strand del dominio catalitico. In questo modo l' $\alpha$ -elica C assume un'orientazione non compatibile con l'attività catalitica; infatti, il residuo Glu310 in essa conservato viene rimosso dal sito attivo impedendo così la formazione del ponte salino con la Lys295. La mancanza di quest'interazione non permette alla Lys295 di coordinare correttamente le molecole di ATP (Boggon T.J. and Eck M.J., 2004 e Roskoski R.J., 2004). In parallelo, il loop di attivazione forma una piccola  $\alpha$ -elica (chiamata anche "Aloop helix") che spinge la Y<sub>A</sub> tra i due lobi del dominio catalitico rendendo inaccessibile il sito attivo ai substrati. Questa configurazione inattiva della tirosin-chinasi viene stabilizzata da un ponte salino tra la Glu310 ed l'Arg409. La transizione dalla forma inibita a quella attiva della chinasi è definita da modifiche conformazionali, in seguito alle quali l' $\alpha$ -elica C ruota e facilita la formazione del ponte salino tra la Glu310 e la Lys295, così che quest'ultima può coordinare efficacemente le molecole di ATP. Il loop di attivazione invece assume una forma più distesa permettendo ai substrati di inserirsi nel sito attivo ed alla Y<sub>A</sub> di essere fosforilata stabilizzando la chinasi in conformazione attiva (Boggon T.J. and Eck M.J., 2004; Roskoski R.J., 2004).



**Figura 3: Diagramma a nastro che illustra la struttura di c-Src.** Il loop di attivazione è tra i due lobi e sequestra la Tyr416. (*Biochem Biophys Res Comm*, 2004. 324: 1155-1164)

## 2.2 Meccanismi di attivazione delle SFKs

La forma chiusa-inattiva e la forma aperta-attiva delle tirosin-chinasi della famiglia Src esistono in un equilibrio dinamico. Poiché la loro attività è finemente regolata nelle normali condizioni cellulari, una modificazione dei meccanismi nei quali esse sono coinvolte può determinarne una costitutiva attivazione. La destabilizzazione della forma chiusa è determinata da diversi fattori: la defosforilazione della coda C terminale, la destabilizzazione delle interazioni intramolecolari SH2 e SH3 dipendenti mediante l'ausilio di ligandi esterni, e l'autofosforilazione della  $Y_A$  (Roskoski R., 2005).

**Defosforilazione della pYT.** In letteratura sono descritte almeno 4 tirosin fosfatasi implicate nel meccanismo di defosforilazione della pYT delle SFK in vari sistemi cellulari: tyrosine-phosphatase 1B (PTP1B), tirosin fosfatasi transmembrana CD45 e tirosin fosfatasi contenenti due domini SH2 in tandem SHP-1 e SHP-2. Il meccanismo non verrà approfondito in questa parte di tesi ma in maniera dettagliata in seguito.

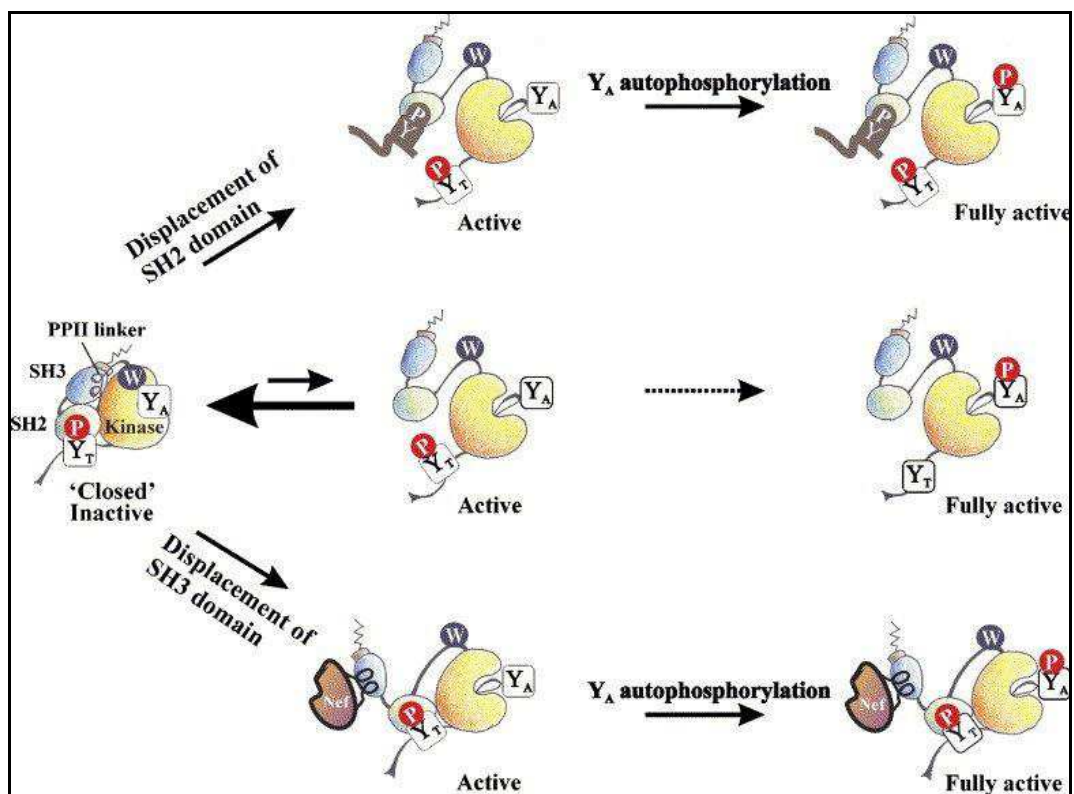
**Destabilizzazione delle interazioni intramolecolari mediate dai domini SH3 e SH2.** L'attivazione delle tirosin-chinasi della famiglia Src può essere determinata anche dalla diretta perturbazione delle interazioni intramolecolari mediate dal dominio SH3 con il segmento PPII-linker e dal dominio SH2 con la pYT. Sono noti numerosi ligandi in grado di competere con l'interazione SH3/PPIIlinker di SFK, tra i quali il recettore del progesterone, p130CAS, AFAP-110 e Nef, proteina accessoria del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1).

Studi di interazione avevano dimostrato che Nef legava il dominio SH3 di Hck con elevata affinità (Moarefi I. et al., 1997); in seguito, altri esperimenti eseguiti in vitro con proteine purificate determinarono che la forma inibita di Hck veniva attivata dal legame di Nef con il dominio SH3 della chinasi per dissociazione dell'interazione intramolecolare mediata dal dominio SH3 (Briggs S.D. et al., 1997). In vivo, inoltre, l'espressione di Nef comportava attivazione costitutiva SH3-dipendente di Hck in fibroblasti che presentavano un fenotipo trasformato. Sorprendentemente, l'attivazione SH3-mediata di Hck era indipendente dall'interazione del dominio SH2 con la coda C-terminale. In questo contesto è stata osservata l'autofosforilazione della YA della chinasi in assenza della defosforilazione della pYT ed il suo rilascio dal dominio SH2 (Lerner E.C. and Smithgall T.E. 2002). La capacità di attivazione di Hck da parte di Nef è mantenuta in presenza di mutazioni nell'intorno della YT nella coda C-terminale di Hck che rendono l'interazione con il dominio SH2 ad alta affinità (Porter M. et al., 2000). Questi risultati dimostrano come sia sufficiente la dissociazione della sola interazione mediata dal dominio SH3 con il segmento PPII-linker di Hck per avere una completa attivazione della tirosin-chinasi (figura 4). D'altra parte, anche la rottura del legame intramolecolare tra pYT ed il dominio SH2 è responsabile dell'induzione dell'attivazione della chinasi. È stato riportato che in vitro l'uso di un peptide contenente il motivo pYEEI e corrispondente alla sequenza del *polyoma virus middle T antigen-derived*, attiva Hck per dissociazione diretta dell'interazione della pYT con il dominio SH2, pur preservando quella SH3-mediata. La conferma di questi dati preliminari è stata ottenuta in vivo modificando la sequenza PPII-linker di Hck rendendola un ligando intramolecolare ad alta affinità per il dominio SH3 (Lerner E.C. et al., 2005). In presenza infatti di un ligando per il dominio SH2, si ha un aumento dell'attività catalitica che si traduce in un segnale di trasformazione fenotipica per i fibroblasti trattati; questi dati dimostrano che il rilascio dell'interazione SH3-linker non è richiesta per l'attivazione indotta dalla dissociazione pYT-SH2. Dopo la dissociazione dell'interazione pYT-SH2, la tirosina inibitoria è accessibile alle fosfatasi. La defosforilazione di pYT coincide con la distruzione di tutte le interazioni intramolecolari ed è seguita dalla fosforilazione del sito attivatorio che



induce una completa attivazione della chinasi (figura 4). Il binding con ligandi esterni permette comunque alle SFK di autofosforilarsi e di rimanere attive anche in presenza della fosforilazione di Y<sub>T</sub>. Questo indica che la fosforilazione della tirosina inibitoria e l'interazione intramolecolare che ne deriva non sono sufficienti a mantenere l'attività SFK in uno stato completamente inibito in vivo (figura 4).

L'attività chinasi è finemente regolata da interazioni intramolecolari che coinvolgono le superfici dei domini SH3 e SH2. Nella conformazione chiusa ed inibita, i domini SH3 ed SH2 si trovano allineati dietro al dominio catalitico, in particolare il segmento SH2-linker si posiziona tra la superficie di binding del dominio SH3 e quella del piccolo lobo interagendo con entrambe e fungendo da adattatore per le due interazioni.



**Figura 4: Differenti modalità di attivazione di pY-SFK dallo stato inattivo a quello attivo** (Biochim. Bioph. Acta 2005. 1754: 210-220.)

Il coinvolgimento di SH2-linker nella regolazione delle SFK è stato preso in esame da Gonfloni ed i suoi collaboratori, che mutarono la Lys249 e la Pro250 rispettivamente in Glu e Gly a livello di c-Src ed Lck (Gonfloni S. et al., 1997). A

seguito dell'espressione dei mutanti in cellule di *Schizosaccharomyces pombe*, si rilevò una significativa Tyr-fosforilazione basale di substrati endogeni compatibile con una costitutiva attività basale Src-dipendente. Inoltre la completa deregolazione ed attivazione di Src e Lck, ottenute dalla mutazione del segmento SH2-linker, erano comparabili con risultati ottenuti per mutazione della Y527F o di residui situati nella tasca di legame del dominio SH2.

Le interazioni intramolecolari mediate dai domini SH3 ed SH2 cooperano attivamente nel ridurre la flessibilità conformazionale del dominio catalitico, impedendo così l'attivazione della chinasi. Questa sinergia è mediata da un piccolo segmento, chiamato "SH3-SH2 connector", il quale unisce i due domini e che si riteneva non avere un ruolo chiave nel meccanismo regolatorio delle SFK. Quando i due domini sono legati ai loro siti di docking interni, i residui del SH3-SH2 connector assumono una struttura rigida che impedisce la transizione conformazionale che induce l'attivazione della chinasi. Il rilascio dell'interazione pY<sub>T</sub>-SH2, che non implica comunque la destabilizzazione di quella mediata da SH3, determina un aumento della flessibilità nella regione del connettore che permette la fosforilazione della tirosina attivatoria e la completa attivazione della chinasi. La costruzione di un mutante c-Src con i tre residui del connettore sostituiti con delle glicine ha permesso di confermare i risultati descritti precedentemente (Young M.A. et al., 2001). L'espressione del costruito infatti coincideva con una forma costitutivamente attiva della chinasi. La flessibilità del linker può inoltre indurre un aumento della disponibilità dei due domini all'interazione con ligandi esterni.

Le proteine "chaperone" come Hsp90 sono implicate nel mantenimento della stabilità e dell'attività di proteine "clienti", incluse le protein-chinasi della famiglia Src (Caplan A.J. et al., 2007). L'interazione avviene per riconoscimento da parte di Hsp90 di una superficie nel lobo N-terminale del dominio catalitico (Citri A. et al., 2006). Il complesso così formato è stabilizzato da interazioni a bassa affinità con cui Hsp90 può mantenere i suoi clienti in un latente ma reale stato attivato. Di norma l'associazione di c-Src e di altri membri della famiglia con Hsp90 è difficile da evidenziare nelle normali condizioni cellulari. Al contrario v-Src, la forma virale costitutivamente attiva di Src, mostra

un'associazione stabile con Hsp90 (Xu Y. and Lindquist S., 1993; Scholz G.M. et al., 2001). Questo fatto si spiega per la diversa affinità di binding di Hsp90 per le sue proteine clienti: l'interazione di Hsp90 con le "co-chaperone" Hsp70 e cdc37 determina variazioni conformazionali del sito di binding per l'ATP tali per cui si ha un aumento dell'affinità di Hsp90 per i suoi ligandi (Kamal A. et al., 2003). La formazione del complesso "multi-chaperone" è fondamentale per lo stato di attivazione di Hsp90.

### ***3 Struttura e funzione delle tirosin chinasi della famiglia Janus***

La famiglia delle Janus chinasi (JAK) è una delle dieci famiglie riconosciute di tirosin chinasi non recettoriali. I membri di questa famiglia sono JAK1, JAK2, JAK3 e Tyrosine kinase 2 (Tyk2); essi sono strettamente coinvolti negli eventi di signaling indotti dalle citochine che attivano i recettori sulla superficie delle cellule.

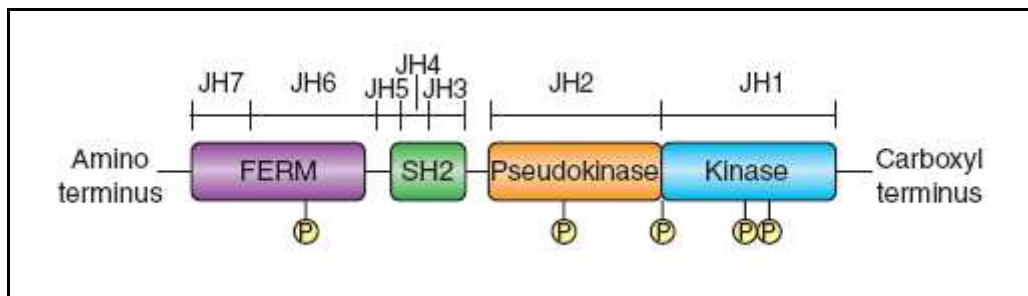
La struttura tridimensionale delle JAKs non è ancora stata determinata; questo perché esse sono delle proteine piuttosto grandi, costituite da più di 1100 aminoacidi e con un massa del peso approssimativo di 120-140 kDa: esprimerle e purificarle diventa quindi problematico (Yamaoka K. et al., 2004).

Queste chinasi presentano una struttura in domini altamente conservata e che è stata individuata nei mammiferi, negli uccelli, nei teleostei e negli insetti; sono stati identificati sette domini "JAK homology" (JH), qui di seguito descritti a partire dall'estremità N-terminale (figura 5).

- il dominio N-terminale contiene un dominio SH2-like (JH3-JH4) e un "homology domain" (JH6-JH7) Band-4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM). Il dominio FERM è costituito da 300 aminoacidi ed è implicato nella mediazione delle interazioni con le proteine transmembrana, come i recettori per le citochine; per molte citochine infatti le JAKs sono importanti per la regolazione dell'espressione sulla superficie cellulare dei recettori associati. (Velazquez L. et al., 1992; Huang L.J. et al., 2001). Inoltre il dominio FERM si lega al dominio chinasi, regolando positivamente l'attività catalitica (Zhou Y.J. et al., 2001). Sfortunatamente, la mancanza del cristallo della struttura delle JAKs limita di molto la comprensione delle interazioni

intramolecolari che le coinvolgono. Non sono inoltre stati identificati molecole partner che di legano al dominio SH2 di queste chinasi.

- JH2 (JAK Homology 2), dominio pseudochinasico, con attività catalitica assente ma con funzione essenzialmente regolatoria; esperimenti nei quali sono stati indotte delle mutazioni a livello di JH2 hanno visto infatti l'abrogazione dell'attività chinasica dell'enzima, a conferma del ruolo critico di questo dominio (Chen M. et al., 2000; Saharinen P. et al., 2000).
- JH1 (JAK Homology 1), il dominio chinasico, localizzato all'estremità C-terminale. Questo dominio possiede tutte le caratteristiche di un tipico dominio tirosin chinasico eucariote; interessante notare che esso presenta caratteristiche molto simili ai domini chinasici della famiglia dei recettori tirosin chinasici per il fattore di crescita epidermico (EGF), suggerendo che la famiglia delle JAKs potrebbe avere avuto origine proprio da quest'altra grande famiglia di protein chinasi (Manning G. et al., 2002).



**Figura 5:** “JAK homology domains” (*Genome Biol.* 2004;5(12):253. Epub 2004 Nov 30.)

Nei mammiferi, JAK1, JAK2 e Tyk2 sono espresse ubiquitariamente. Al contrario, l'espressione di JAK3 è più limitata; essa è infatti espressa prevalentemente nelle cellule ematopoietiche ed è altamente regolata a seconda dello sviluppo e all'attivazione della cellula (Kawamura M. et al., 1994; Musso T. et al., 1995; Tortolani P.J. et al., 1995).

A livello cellulare le JAKs possono essere presenti nel citosol se espresse sperimentalmente in assenza di recettori per le citochine ma, a causa della loro stretta associazione con questi recettori, esse si localizzano solitamente negli endosomi e nella membrana plasmatica, in contatto con i recettori (Hofmann S.R. et al., 2004; Ragimbeau J. et al., 2003).

La forma inibita delle chinasi Janus è determinata dalla presenza del dominio JH2 definito come dominio autoinibitorio. Infatti, mentre l'espressione di un dominio JH1 isolato porta ad un'attività costitutiva di JAK2, il costrutto che presenta anche il dominio pseudochinasico JH2 risulta altamente inibito (Berchtold S. et al., 1997). Successivi esperimenti di mutagenesi hanno dimostrato con più evidenza che la regione compresa tra gli aminoacidi 619 e 670 di JH2 è necessaria per l'inibizione di JH1 (Saharinen P. et al., 2003); inoltre le mutazioni di due residui distinti Tyr570Phe e Glu665Lys sempre in JH2, rendono la chinasi costitutivamente attiva (Luo H. et al., 1997, Argetsinger L.S. et al., 2004).

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

Anche le proteine SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling), la cui sintesi proteica è indotta da STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), interagiscono sia con la forma attivata JAK, sia con i residui fosfotirosinici del recettore ad essa associata, impedendo così la propagazione del segnale (Wormald S. and Hilton D.J., 2004).

Le JAKs sono costitutivamente associate a specifici recettori; in seguito a questo legame, i recettori dimerizzano, inducendo un cambio conformazionale nelle chinasi e permettendo loro di esprimere il proprio potenziale enzimatico. Una volta attivate, le JAKs sono in grado di fosforilare diversi residui tirosinici del recettore stesso e creano dei siti di aggancio per molecole contenenti domini SH2, comprese le STATs (signal transducers and activators of transcription). Molti recettori per fattori di crescita e citochine utilizzano questa via, come ad esempio i recettori per l'interferone (Velazquez L. et al., 1992) e quelli per le citochine ematopoietiche di tipo I (interleuchine, TPO, ecc.) (Ihle J.N., 1995). In assenza di JAKs le citochine, che mancano di attività chinasica intrinseca, non sono in grado di iniziare eventi di signaling.

#### ***4 Protein fosfatasi***

Come già detto, fosforilazione e defosforilazione proteica sono degli eventi fondamentali della cellula mediati rispettivamente da chinasi e fosfatasi, che regolano una grande quantità di funzioni come la crescita, la divisione, l'adesione

e la motilità cellulare (Soulsby M. and Bennett AM., 2009). Così come è possibile suddividere le 518 protein chinasi in tirosin chinasi e serin/treonin chinasi (Manning G. et al., 2002), allo stesso modo le fosfatasi possono essere suddivise in base alla struttura e alla specificità di substrato, in protein tirosin fosfatasi (PTPs) e protein serin/treonin fosfatasi (PSPs).

Nonostante sia le PTPs che le PSPs catalizzino entrambe una reazione di defosforilazione, i meccanismi che esse utilizzano sono differenti, ed è stata proprio la comprensione di questa diversità del meccanismo catalitico e dei cambiamenti conformazionali nella struttura delle fosfatasi che ha permesso di sviluppare nuovi potenti e selettivi inibitori.

Le PSPs utilizzano una meccanismo d'azione catalizzato da metalli: due ioni metallici,  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$ , coordinati da residui conservati di istidina e acido aspartico e un residuo di asparagina, sono localizzati nel sito attivo. Gli ioni metallici legano e attivano una molecola d'acqua che inizia l'attacco nucleofilo sull'atomo di fosforo (Shi Y., 2009). Il meccanismo d'azione delle PTPs verrà descritto in seguito in maniera più approfondita, in quanto argomento d'interesse per questo lavoro di tesi.

#### **4.1 La superfamiglia delle protein tirosin fosfatasi**

Le protein tirosin fosfatasi (PTPs) costituiscono una superfamiglia di enzimi specifici che svolgono funzioni critiche in molte vie di trasduzione del segnale. I membri della superfamiglia sono caratterizzati dalla presenza, nel dominio catalitico, di un motivo consenso HCxxxxR che permette la classificazione in due categorie: PTPs classiche (classical PTPs) e PTPs duali (dual-specificity PTPs) (Tonks N.K. and Neel B.G., 2001). Le PTPs che catalizzano la reazione di defosforilazione unicamente di fosfotirosine (pTyr) fanno parte delle PTPs classiche e possono contenere uno o due domini catalitici di circa 240-250 aminoacidi. Il motivo consenso è rappresentato dalla sequenza VHCSAGIGRTG (Lorenz U., 2009). Le PTPs classiche vengono suddivise a loro volta in due gruppi, in base alle sequenze che fiancheggiano il dominio catalitico: nel primo gruppo si collocano le fosfatasi transmembrana (TM), nel secondo le fosfatasi non transmembrana (non-TM). Le sequenze cosiddette fiancheggianti svolgono

funzioni regolatorie, in quanto rappresentano siti di interazione per le proteine target e/o per le proteine regolatorie.

Le PTPs duali sono fosfatasi che defosforilano non solo residui di fosfotirosine (pTyr) ma anche residui di fosfoserina e fosfotreonina (pSer/pThr). Il motivo consenso di queste proteine è costituito dalla sequenza HCXXGXXR. A questa categoria appartengono le MAP chinasi-fosfatasi (MKPs) e i membri della famiglia cdc25.

Diversamente dalle PSPs, le PTPs non richiedono la presenza di ioni metallici e un meccanismo catalitico a doppio step per esplicare la loro funzione. La chiave della loro attivazione infatti è il loop catalitico conservato contenente cisteina, situato al di sotto della tasca del sito attivo, e un loop flessibile formato da tre aminoacidi, triptofano, prolina e acido aspartico (WPD), che stanno al di sopra della tasca. Nelle PTPs classiche, la profondità della tasca del sito attivo è selettiva esclusivamente per i substrati contenenti tirosina fosforilata, poiché i residui di fosfoserina e fosfotreonina non sono sufficientemente lunghi per raggiungere la cisteina nel sito catalitico. La minor selettività delle PTPs duali, invece, dipende dal fatto che esse possiedono un sito attivo più superficiale, che riesce ad essere accessibile sia alle fosfotirosine che alle fosfoserine e fosfotreonine.

Il potenziale elettrostatico della tasca è per lo più positivo, creando una superficie adatta alla presenza del gruppo fosfato che si lega. In seguito al legame con il substrato, il loop WPD si chiude sopra il sito attivo e nella prima parte della reazione la cisteina nucleofila forma un intermedio fosfo-cisteinico così come il residuo di acido aspartico del loop WPD forma un legame a idrogeno con l'ossigeno fenolico del residuo di fosfotirosina. Nella seconda parte della reazione, lo stesso aspartato si comporta da base, permettendo la deprotonazione di una molecola d'acqua e portando all'idrolisi dell'intermedio fosfoenzimatico (Barr A.J., 2010).

All'interno del gruppo delle fosfatasi non-transmembrana, in questa tesi sono state meglio caratterizzati gli enzimi PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) e le fosfatasi SHP-1 e SHP-2 (rispettivamente Src homology two-domain containing phosphatase 1 e 2).

#### 4.1.1 La struttura delle tirosin fosfatasi SHP-1 e SHP-2

SHP-1 e SHP-2 sono fosfatasi a localizzazione citosolica (Tonks N.K. and Neel B.G., 2001).

Il gene umano della fosfatasi SHP-1 è localizzato sul cromosoma 12 (12p13). Il gene *shp-1* comprende 17 esoni, ed è lungo circa 17kb (Wu et al., 2003). Il gene *shp-1* possiede due differenti promotori, la cui attività è tessuto specifica e che danno origine a due differenti isoforme della proteina. Queste differiscono fra loro per il codone di inizio utilizzato. I due differenti codoni di inizio sono localizzati negli esoni 1 e 2, rispettivamente. Le due isoforme quindi differiscono per la sequenza aminoacidica all’N-terminale. L’espressione delle due isoforme è tessuto specifica: il promotore 1, localizzato circa 7kb a monte del promotore 2, è attivo in tutte le cellule tranne che nelle linee ematopoietiche, mentre il promotore 2 è attivo esclusivamente in queste ultime. I residui aminoacidici 1-108 e 116-208 all’estremità N-terminale della catena polipeptidica formano due Src-homology-2 domain, denominati rispettivamente domini N-SH2 e C-SH2. I residui aminoacidici 270-532 formano il dominio catalitico a cui segue una coda C-terminale (Figura 6).

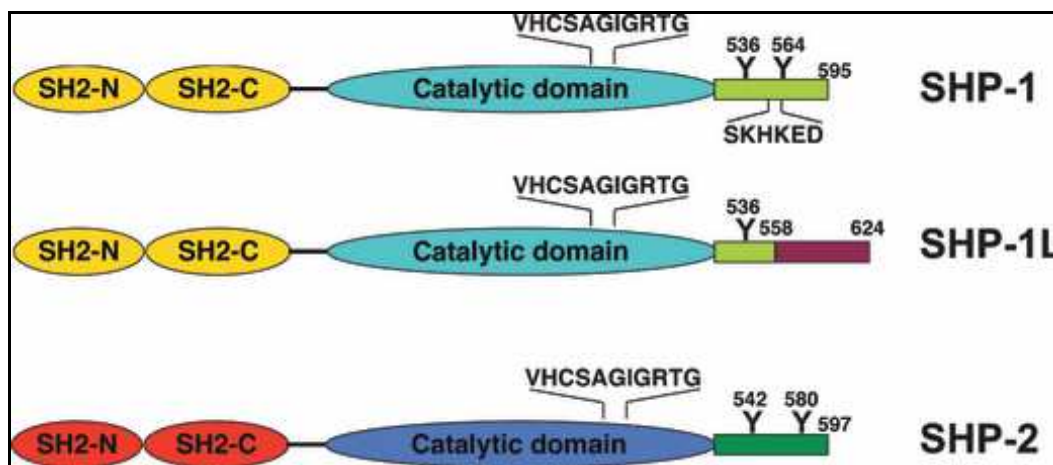


Figura 6. Domini strutturali delle tirosin fosfatasi SHP-1, SHP-2 e SHP-1L

Il gene umano della fosfatasi SHP-2 è localizzato anch’esso sul cromosoma 12 (12q24). La fosfatasi SHP-2 è una proteina che viene espressa ubiquitariamente in vari tipi di cellule e di tessuti. I residui aminoacidici 6-101 e 112-211 formano, come i due domini all’N-terminale di SHP-1, due domini SH2 (Src-homology-2



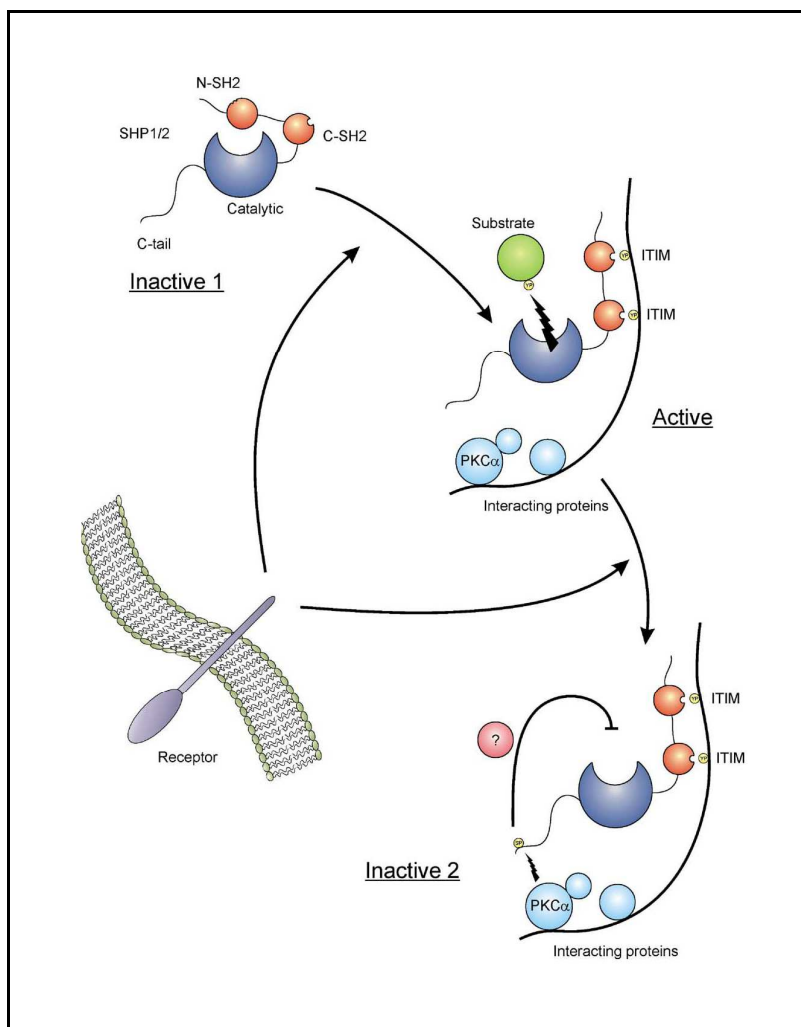
domains), denominati anche in questo caso domini N-SH2 e C-SH2. La regione compresa fra i residui aminoacidici 276-519 contiene il dominio catalitico. Le strutture tridimensionali delle fosfatasi SHP-1 e SHP-2 presentano un elevato livello di omologia, anche se svolgono ruoli differenti nella trasduzione del segnale.

Il dominio C-terminale di queste fosfatasi contiene residui tirosinici e serinici fosforilabili e svolge un ruolo critico nel regolare le funzioni delle tirosin-fosfatasi. Due residui tirosinici situati nel C-terminale di SHP-1 (Y536 e Y564) e di SHP-2 (Y524 e Y580) possono venir fosforilati sotto vari stimoli, influenzando la funzione e l'attività di queste PTPs. La tirosin fosforilazione di Y536 e di Y564 correla con un aumento dell'attività fosfotirosinfosfataseica.

Un motivo composto dai seguenti sei aminoacidi SKHKED localizzati nel C-terminale (aa 557-562) di SHP-1 è necessario e sufficiente per la localizzazione ai lipid rafts (Sankarshanan et al., 2007).

È stata identificata anche una variante di splicing di SHP-1 che genera SHP-1L, che differisce al C-terminale. SHP-1L è più lunga di 29 aa, manca del potenziale sito di fosforilazione Y564, ma mantiene il sito Y536. Inoltre SHP-1L presenta un motivo ricco in prolina al C-terminale (PVPGPPVLSP), il quale può mediare il legame con proteine contenenti un dominio SH3, come la tirosin chinasi Lyn (Jin et al., 1999). Un simile motivo ricco in prolina è presente anche al C-terminale di SHP-2, ma è assente in SHP-1.

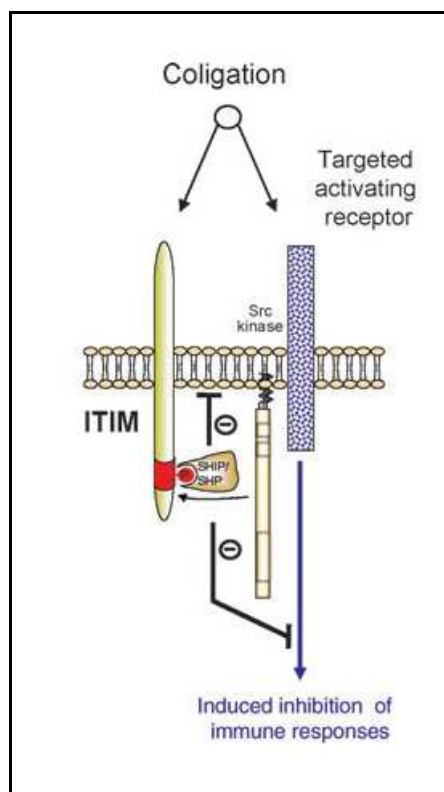
I domini N-terminale sono coinvolti nella regolazione dell'attività fosfataseica dell'enzima. L'attività catalitica, sia di SHP-1 che di SHP-2, è soppressa da un'interazione intramolecolare che coinvolge il dominio N-SH2. Questa interazione impedisce l'accesso del substrato al sito attivo della fosfatasi. Il legame di un fosfopeptide con il dominio C-SH2 comporta una modificazione conformazionale della molecola per cui il dominio N-SH2 si apre per interagire con un secondo fosfopeptide, liberando così il dominio catalitico e rendendolo pronto a catalizzare la reazione (Figura 7).



**Figura 7: Meccanismo di regolazione di SHP-1 e SHP-2.** I domini N-terminali regolano l'attività fosfatase e mediano il legame con fosfo-peptidi. I domini C-terminali presentano tirosine e/o serine fosforilabili, permettono l'interazione con le membrane e la localizzazione ai lipidic rafts e sono ricchi in prolina (*Cell Signal. 2005 Nov;17(11):1323-32*)

**Il coinvolgimento delle tirosin fosfatasi SHP-1 e SHP-2 nei meccanismi della trasduzione del segnale mediato da recettori di membrana.** La maggior parte dei recettori inibitori espressi sulle cellule contiene una sequenza ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) nella porzione citoplasmatica. L'oligomerizzazione di tali recettori indotta dal legame del ligando induce la fosforilazione delle tirosine dell'ITIM, ad opera della famiglia delle chinasi Src, con conseguente reclutamento della tirosin fosfatasi SHP-1, tramite il dominio SH2, che sopprime l'attivazione cellulare promuovendo reazioni di defosforilazione a cascata.

Mentre SHP-1 funziona come regolatore negativo in diversi sistemi cellulari, anche quelli non ematopoietici, la tirosin fosfatasi SHP-2 è definita un effettore positivo nella trasmissione di segnali all'interno della cellula in quanto partecipa sia all'attivazione della via Ras/MAPK che all'attivazione della via PI3K/AKT. La tirosin fosfatasi SHP-1 si può associare tramite il dominio N-SH2 a molti substrati. Nelle cellule B si può associare a Lyn inducendo defosforilazione del sito autofosforilativo e conseguente deattivazione della chinasi (Somani et al., 2001). SHP-1 si può associare anche ai recettori transmembrana, come ad esempio CD5, CD72 e CD22 (Figura 8).



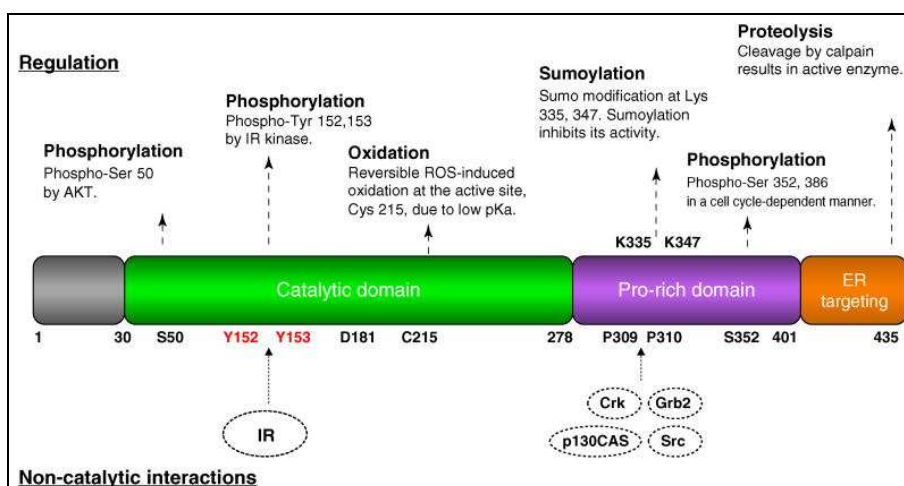
**Figura 8: Inibizione indotta da ITIM.** Le risposte immunitarie attivatorie sono regolate negativamente in seguito al legame con un recettore contenente ITIM. La fosforilazione delle tirosine presenti nell'ITIM da parte delle SFKs crea dei "docking-site" per le protein tirosin fosfatasi contenenti domini SH2 (SHP) o per le inositol fosfatasi contenenti domini SH2 (SHIP); questi eventi spengono le risposte di tipo immunitario (*Immunol Rev.* 2009 Nov;232(1):59-71)

#### 4.1.2 La struttura della tirosin fosfatasi PTP1B

Le prime evidenze di una attività fosfataseica in contrasto con quella chinaseica risalgono al 1981, quindi non molto tempo dopo l'identificazione di v-Src quale prima protein tirosin chinasi (Brautigan D.L. et al., 1981); meno di dieci anni

dopo venne purificata per la prima volta PTP1B da un estratto di placenta umana (Tonks N.K. et al., 1988) ed in seguito alla scoperta di questa, vennero rapidamente identificate altre fosfatasi.

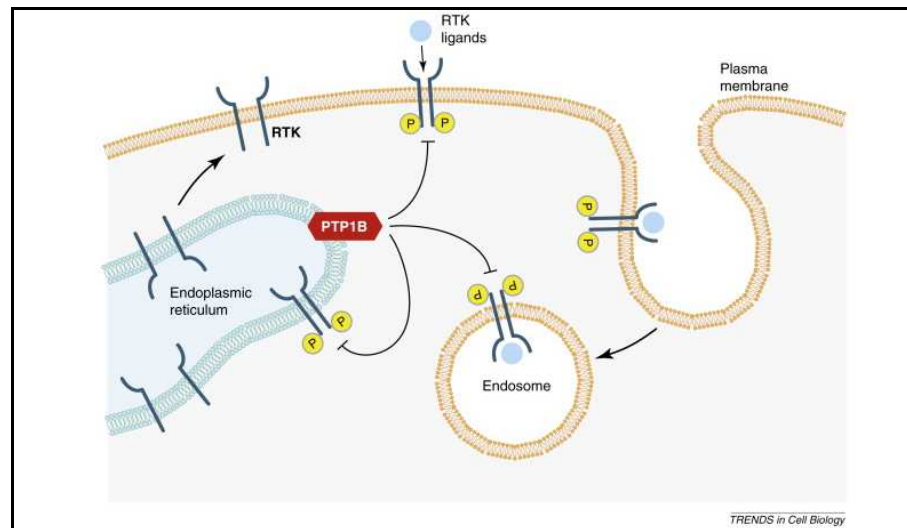
PTP1B possiede un dominio catalitico N-terminale (residui 1-300) seguito da una regione regolatoria di circa 80-100 residui e un dominio localizzato sulle membrana (residui 400-435) che ancora l'enzima al lato citoplasmatico del reticolo endoplasmatico (Frangioni J.V. et al., 1992; Woodford-Thomas T.A. et al., 1992). Questo enzima è abbondantemente espresso e ha una notevole attività catalitica che in molte circostanze è strettamente controllata. Oltre alla sua localizzazione sulla superficie del reticolo endoplasmatico, che può limitare l'accesso ai substrati, sono conosciuti quattro meccanismi che regolano l'attività di PTP1B e che talvolta sono presenti in contemporanea: ossidazione, fosforilazione, sumoilazione e proteolisi (Yip S.C. et al., 2010) (figura 9).



**Figura 9: Domini strutturali e regolazione di PTP1B** (*Trends Biochem Sci.* 2010 Aug;35(8): 442-9. Epub 2010 Apr 8.)

**Meccanismo di regolazione delle RTKs da parte di PTP1B localizzata sul reticolo endoplasmatico.** Una caratteristica importante dell'attività della PTP1B è la sua localizzazione intracellulare. Una regione idrofobica di 35 aminoacidi al C-terminale della fosfatasi permette la sua localizzazione sul reticolo endoplasmatico (ER), dove il suo dominio catalitico è esposto al citoplasma (Frangioni J.V. et al., 1992): la quota di proteina che si ritrova nell'ER è predominante rispetto a quella che è possibile individuare altrove.

Molti studi hanno indagato il meccanismo per il quale PTP1B può avere accesso alle RTKs da questo compartimento intracellulare. Una spiegazione possibile è che la fosfatasi possa regolare le chinasi solo quando entrambe sono presenti nell'ER, durante la biosintesi delle RTKs (figura 10).



**Figura 10: Siti di regolazione di RTKs da parte di PTP1B** (*Trends Cell Biol.* 2010 Nov;20(11):672-9. Epub 2010 Sep 23.)

Infatti è noto che molte volte, in condizioni di overespressione, le RTKs nella via di biosintesi possono essere tirosin fosforilate e attivate con modalità indipendente da legami (Lammers R. et al., 1993). Poco dopo la scoperta della localizzazione di PTP1B nell'ER, venne dimostrato che queste RTKs non ancora mature sono particolarmente sensibili alla overespressione di PTP1B.

Poiché PTP1B modula la fosforilazione di RTKs mediata da legame, è molto probabile che PTP1B possa avere accesso alle RTKs sulla superficie delle cellule anche in seguito all'attivazione chinastica; non è ancora però chiaro dove avvenga questa interazione a livello cellulare.

La maggior parte dei dati supportano il ruolo chiave del meccanismo di endocitosi nell'avvicinare RTKs e PTP1B. Le RTKs, che sono internalizzate dalla cellula subito dopo il loro legame, si muovono nella cellula tra i diversi compartimenti endosomiali, per essere degradate o riciclate (figura 10). Durante questi eventi, il dominio catalitico delle RTKs rimane esposto al citoplasma, permettendo la

trasduzione di segnali ma rimanendo allo stesso tempo suscettibile alla defosforilazione da parte delle fosfatasi.

Mentre PTP1B regola la fosforilazione delle RTKs, essa è anche target di modificazioni post-trasduzionali che seguono l'attivazione delle chinasi. Come è stato già detto nel precedente paragrafo, vi sono numerosi meccanismi mediante i quali le RTKs controllano l'attività di PTP1B, quali l'ossidazione, la fosforilazione e la sumoilazione (Stuible M. et al., 2008).

# *Obiettivi generali*





## OBIETTIVI GENERALI

Le protein tirosin fosfatasi (PTPs) costituiscono una superfamiglia di enzimi specifici che svolgono funzioni critiche in molte vie di trasduzione del segnale; esse si inseriscono in un complesso sistema insieme a protein tirosin chinasi (PTK) e dominio “Src homology 2 domain” (SH2), che costituisce il “*writer*” (PTK), “*eraser*” (PTP) e “*reader*” (SH2) toolkit. La relazione e la combinazione di questi tre elementi è in grado di determinare una fine e complessa regolazione a livello di signalling.

Nel corso del mio dottorato è stata studiata la regolazione del signaling in tre diversi modelli patologici: disordini mieloproliferativi, trombocitopenia indotta da eparina e fibrosi epatica. L’attenzione è stata focalizzata in particolare sul ruolo delle PTPs, sia come regolatori positivi che negativi delle vie di segnale.

I risultati ottenuti sono di seguito riportati.



# *Materiali e metodi*



## ***1 Materiali***

[ $\gamma^{33}\text{P}$ ]ATP è stato acquistato da Amersham Pharmacia Biotech. PP2, SU6656, AG490, JAK2-inhibitor-I, calpeptina, NSC-87877 (inibitore SHP-1/SHP-2), PTP-inhibitor-I, cocktail di inibitori proteasici e gli anticorpi secondari utilizzati per le rivelazioni anticorpali sono stati acquistati da Calbiochem.  $\alpha$ -trombina umana, cocktail di inibitori fosfatasici, poly(Glu<sub>4</sub>Tyr), PDGF- $\beta$ , l'anticorpo anti- $\beta$ -actina, anti-GADPH, anti- $\alpha$ -SMA e l'anticorpo secondario goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> e tutti gli altri reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Gli anticorpi contro JAK2, p-JAK2, Src-p-Tyr416, anti-Src, Lyn-p-Tyr507, STAT5, p-STAT5, STAT3, P-STAT3, anti-LAT-p-Tyr191, anti-cortactina, anti-Syk e anti-p-Tyr (PY20) sono stati acquistati da Millipore. Anti-Fyn, anti-Lyn, anti-SHP-1, anti-SHP-2, anti Akt, anti-p-Akt, anti-Fc $\gamma$ RIIA e anti PI3-K e anti-PDGFR- $\beta$  da Santa Cruz Biotechnology. Anti-Src-p-Tyr527, anti-p-ERK1/2, anti ERK1/2 sono stati acquistati da Cell Signaling. Anti-SHP-1-p-Ser591, anti-SHP-1-p-Tyr564 e anti-SHP-2-p-Tyr580 sono stati acquistati da ECM Biosciences. Anti-GFAP è stato acquistato da Dakocitomation. FTY720 è stato acquistato da Alexis. La trombopoietina umana ricombinante dalla R&D Systems. L'ECL (Enhanced Chemiluminescent substrate for detection of HRP) per le rivelazioni anticorpali è stato acquistato da Pierce. Il DELFIA<sup>®</sup> Cell Proliferation è stato acquistato da PerkinElmer mentre il Lipofectamine<sup>™</sup> RNAiMAX ed i siRNA per SHP-1 e SHP-2 sono stati acquistati da Invitrogen. L'anticorpo mAB IV.3 è stato gentilmente fornito dal Prof. Mauro Torti (Università degli studi di Pavia). Il peptide cdc2(6-20) è stato gentilmente fornito dal Dr. Oriano Marin (Università degli Studi di Padova). I campioni di sangue dei pazienti PV ed ET sono stati gentilmente forniti dalla Prof.ssa Maria Luigia Randi, i campioni di sangue dei donatori utilizzati per lo studio dei polimorfismi di Fc $\gamma$ RIIA sono stati gentilmente analizzati dalla Dr.ssa Pamela Scarparo mediante PCR allele specifica (laboratorio UOC di Medicina Interna CLOPD, Dipartimento Scienze Mediche e Chirurgiche).

## **2 Metodi**

### **2.1 Metodi comuni alle tre parti di tesi**

#### **Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS/PAGE).**

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide è un metodo utilizzato per separare le proteine di una miscela e determinarne il peso molecolare. Prima di essere caricati su gel, i lisati cellulari vengono bolliti per circa 5 minuti in presenza di 2-mercaptoetanololo, che scinde i legami disolfuro destabilizzando la struttura terziaria delle proteine, e di SDS. Il dodecilsolfato di sodio (SDS) è un detergente ionico che si lega saldamente alle proteine provocandone la denaturazione. In presenza di un eccesso di SDS, per ogni grammo di proteina si legano circa 1,4 grammi di detergente, fornendo alla proteina una quantità di carica negativa costante per unità di massa. In questo modo durante l'elettroforesi i complessi proteina-SDS si muovono tutti verso l'anodo e, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, la loro mobilità risulta inversamente proporzionale al peso molecolare. Contemporaneamente ai campioni viene fatto migrare anche uno standard, cioè una miscela di proteine di peso molecolare noto, utile alla determinazione delle proteine in esame.

Il gel di poliacrilamide viene preparato seguendo il metodo Laemmli (Laemmli, 1970). Il gel è composto di due parti:

- Stacking gel (parte superiore) a pH 6.8, che serve a concentrare le proteine del campione, consentendone la partenza da uno stesso fronte;
- Running gel (parte inferiore) a pH 8.8, nel quale avviene la separazione delle proteine.

Il gel finale ha dimensioni di 8x10 cm e viene fissato nell'apposito apparecchio (Mighty small-se 250 hoefers scientific instruments). All'interno dell'apparecchio si aggiunge un tampone che consente il trasferimento di corrente tra i due elettrodi e quindi la corretta corsa e separazione delle proteine. Il tampone di corsa è costituito da:

- Tris 25 mM
- glicina 0.19 M
- SDS 3.4 mM

La durata della corsa elettroforetica è di circa 1h, a 40mA/gel.

A fine corsa si effettua il Western-blot.

**Western-blot e rivelazione anticorpale.** Successivamente alla corsa elettroforetica si procede al trasferimento delle bande proteiche dal gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrocellulosa con la tecnica del Western blot (350 mA, 200 V, 2,30 h). Il tampone utilizzato per il trasferimento è costituito da:

- Tris 25 mM
- glicina 192 mM
- metanolo 20%
- SDS 0.1%

Dopo il western-blot, le membrane di nitrocellulosa vengono saturate per 1h, allo scopo di bloccare i siti aspecifici di interazione idrofobica. Il tampone che si utilizza è composto da:

- Tris/HCl 50 mM, pH 7.5
- NaCl 150 mM
- BSA 3%
- Le membrane sono poi incubate (2,30 h a temperatura ambiente o over-night a 4°C) con gli opportuni anticorpi, diluiti nel seguente tampone (TAMPONE A), addizionato di NaN<sub>3</sub> 0,02%.
- Tris/HCl 50 mM, pH 7.5
- NaCl 150 mM
- BSA 1%

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, si eseguono tre lavaggi di 10 minuti ciascuno, utilizzando il TAMPONE A addizionato di Tween 0,1%. Le membrane sono successivamente incubate per 30 minuti con un anticorpo secondario anti-IgG (ottenuto contro la specie animale immunizzata per avere il primo anticorpo) diluito nel TAMPONE A. Dopo ulteriori tre lavaggi, si procede con la rivelazione anticorpale mediante il sistema ECL, grazie al quale, in corrispondenza del complesso antigene-anticorpo, si origina una reazione di chemiluminescenza, che viene rivelata con una lastra autoradiografica che si impressiona a contatto con la membrana di nitrocellulosa.

**Analisi statistica.** I dati della prima parte della tesi sono presentati con la significatività ( $\pm$  SD) e confrontati usando l'analisi della varianza a una via seguita dal post hoc test di Bonferroni. Un valore P minore di 0,05 è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le statistiche sono state effettuate usando il software GraphPad.

## **2.2. Metodi relativi alla prima e seconda parte di tesi**

**Preparazione della sospensione di piastrine e stimolazione.** Le piastrine vengono isolate da sangue fresco prelevato da donatori sani o pazienti. Il sangue viene raccolto in Citrato Acido-Destrosio (ACD) 1,5:8,5 v/v e centrifugato a 250 x g per 20 minuti a temperatura ambiente e senza freno; si preleva quindi il surnatante che rappresenta il PRP (plasma ricco di piastrine), al quale si aggiunge l'apirasi (2 U/mL) e si procede ad una veloce centrifuga (5 minuti a 250 x g) per eliminare eventuali globuli rossi o aggregati. Il PRP viene quindi centrifugato a 750 x g per altri 20 minuti a temperatura ambiente e senza freno: dopo questo tempo si elimina il surnatante ottenuto che rappresenta il PPP (plasma povero di piastrine) e si risospende il precipitato di piastrine in Tyrode buffer pH 6.2 (137 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>) aggiunto di apirasi (3 U/mL). Si procede ad un lavaggio mediante una centrifuga a 750 x g per 20 minuti a temperatura ambiente e senza freno; il precipitato viene risospeso in Tyrode buffer pH 7.4 al quale si aggiunge 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Normalmente si lavora ad una concentrazione finale di circa  $1 \times 10^9$  piastrine/mL. La conta piastrinica viene valutata mediante un metodo turbimetrico, basato sulla misura di assorbanza ottica alla lunghezza d'onda di 640 nm (alla quale praticamente non ci sono gruppi cromofori assorbenti). Dal valore di densità ottica, letto allo spettrofotometro, si risale al numero di piastrine, mediante una curva di taratura standard precedentemente preparata sulla base della conta eseguita al microscopio ottico utilizzando la camera conta globuli di Thoma. Una concentrazione di  $225 \times 10^6$  di piastrine/ml corrisponde, con buona approssimazione, ad una lettura di densità ottica pari a circa 1,200.



Le piastrine lavate sono stimulate mediante incubazione a 37°C con gli agonisti e/o inibitori; le reazioni vengono bloccate lisando rapidamente i campioni in Laemmli buffer, composto da:

- Tris/HCl 0,625 M, pH 6,8
- SDS 10%
- 2-mercaptoetanolo 5%
- glicerolo 50%
- pironina in tracce

**Immunoprecipitazione.** Le piastrine ( $2 \times 10^8$ /assay) vengono lisate mediante sospensione (1 ora a 4°C) in 450 µL di buffer di immunoprecipitazione (IP) (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 10% glicerolo, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM sodio ortovanadato, inibitori di fosfatasi e cocktail di inibitori di proteasi). Dopo centrifugazione (14000g 30'), i supernatanti sono incubati per 5 ore a 4°C con gli anticorpi appropriati legati alla proteina A-Sepharose. Gli immunocomplessi sono lavati 3 volte con 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, contenente cocktail di inibitori fosfatasici e 1 mM di sodio ortovanadato.

**Saggio di attività tirosin chinasi in vitro.** L'attività chinasi di Src e JAK2, immunoprecipitate come precedentemente descritto, è determinata in 50 µL di medium di fosforilazione contenente 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 µM [ $\gamma$ <sup>33</sup>P]ATP (attività specifica, 1000 dpm/pmol), 200 µM di sodio ortovanadato, e 200 µM di peptide cdc2 (6-20) per l'attività di Src o 1 mg/mL di polyGlu<sub>4</sub>Tyr per l'attività di JAK2. Dopo 10 minuti di incubazione a 30°C, la reazione viene bloccata e i campioni si sottopongono a SDS/PAGE. La fosforilazione di <sup>33</sup>P viene quantificata mediante Packard Cyclone.

**Determinazione della concentrazione citosolica di [Ca<sup>2+</sup>].** Le piastrine sono incubate con la sonda fluorescente fura 2 acetoxy-methyl-ester e risospese alla concentrazione di  $2 \times 10^8$  cellule/ml nel buffer basale aggiunto di 0,5 mM Ca<sup>2+</sup>. L'intensità di fluorescenza è misurata in condizioni termostate (a 37°C) e di agitazione magnetica nelle cuvette, valutando eccitazione ed emissione rispettivamente alle lunghezze d'onda di 340 nm e 505 nm.

**Aggregazione piastrinica.** I saggi di aggregazione sono effettuati in 250 µl di piastrine ( $3 \times 10^8$ /assay) risospese in Tyrode pH 7.4 al quale è stato aggiunto 1

mM CaCl<sub>2</sub> e 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Gli stimoli vengono eseguiti in condizioni termostate, a 37°C, e in costante agitazione. L'aggregazione è stata monitorata mediante l'aggregometro Elvi Logos.

**Frazionamento subcellulare.** Le piastrine ( $4 \times 10^8$ ) vengono sonicate in 1 ml di buffer isotonic (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 250 mM saccarosio, 1mM ortovanadato, cocktail di inibitori proteasici). Nuclei e cellule non rotte sono precipitate mediante centrifugazione a 1000g per 10 minuti. Il sopranatante viene successivamente centrifugato a 100000g per 1 ora per separare il citosol dai microsomi. I microsomi sono quindi risospesi in 1 ml dello stesso buffer isotonic usato per la sonicazione.

**Preparazione della [<sup>33</sup>P]-fosfo banda 3.** La banda 3 fosforilata si ottiene incubando le membrane eritrocitarie (15 µg) a 30°C con p36<sup>syk</sup> e la tirosin chinasi Lyn in presenza di [<sup>33</sup>P]ATP. Dopo 10 minuti di incubazione il campione viene centrifugato a 14000g e il pellet è stato lavato 3 volte con il TAMPONE B (25 mM imidazolo, pH 7, 1 mM di EDTA, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 10% glicerolo, 10 mM beta-mercaptoetanolo, 10 mg/ml leupeptina, 50 mM PMSF) e infine risospeso nel medesimo tampone.

**Saggio di attività tirosin fosfatasica.** Le piastrine ( $10^6$ /assay) sono state lisate nel buffer di IP contenente 0,1% Nonidet P-40. Si saggia l'attività tirosin fosfatasica aggiungendo a 25 µl di lisato piastrinico 25 µl di TAMPONE B e 0,3 µg di <sup>33</sup>P-fosfo banda 3. Dopo 1 minuto di incubazione a 30°C, la reazione viene bloccata e sottoposta a SDS/PAGE. La defosforilazione di <sup>33</sup>P-fosfo banda 3 è valutata sia mediante analisi con Packard Cyclone che con l'autoradiografia e conta della <sup>33</sup>P-banda 3 con lo scintillatore.

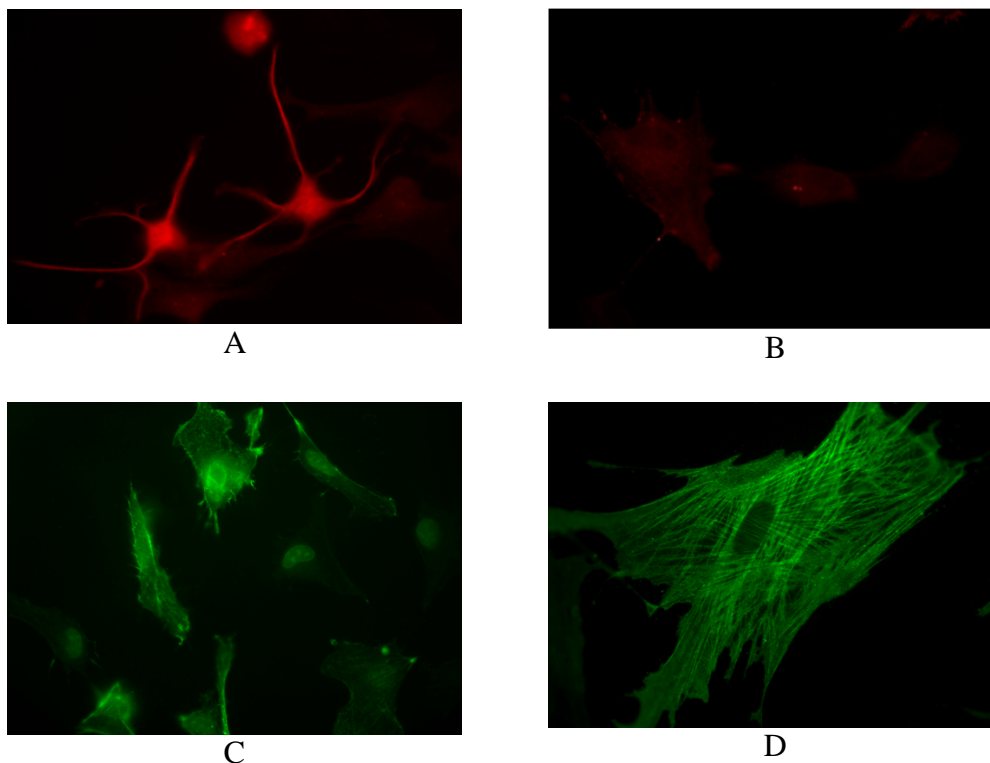
**Spreading piastrinico.** Il coating viene effettuato over-night con 500 µl/pozzetto della soluzione desiderata (fibrinogeno 100 µg/ml in PBS 1X filtrato, BSA 0,5% in PBS 1X filtrato, IV.3 5 µg/ml) su una piastra multiwell da 12 con i vetrini tondi da 15 mm. Dopo il coating, i pozzetti vengono lavati 2 volte con 1 ml di PBS 1X filtrato e saturati con 500 µl di BSA 1% in PBS 1X filtrato per 1 h. Dopo 2 lavaggi con 1 ml di PBS 1X filtrato si seminano 500 µl di piastrine lavate e portate alla concentrazione di  $2 \times 10^7$  cellule/ml (stimolate o non stimolate) aggiunte di glucosio e calcio; la piastra è lasciata 1 h a temperatura ambiente.

Successivamente si toglie il surnatante e, dopo 2 lavaggi con PBS 1X filtrato, si fissano le piastrine con 500 µl di paraformaldeide al 3% per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo altri 2 lavaggi con 1 ml di PBS 1X filtrato, viene effettuata la permeabilizzazione con TRITON 0,25% (soluzione preparata in PBS 1X filtrato) a freddo per 10 minuti. Dopo 3 lavaggi con 1 ml di PBS 1X filtrato si colorano i vetrini con Falloidina-TRITC (1:500) per almeno 1 h al buio a temperatura ambiente. Dopo altri 2 lavaggi con 1 ml di PBS 1X filtrato, i vetrini vengono montati con mowiol sul vetrino porta-oggetti e tenuti al buio (over-night) fino alla lettura al microscopio a fluorescenza (ingrandimento 40X) Olympus BX51.

### **2.3. Metodi relativi alla terza parte di tesi**

**Ottenimento di una coltura primaria di HSCs da fegato di ratto.** Dopo il sacrificio dell'animale si preleva il fegato dal ratto con l'ausilio di forbici sterili, cercando di preservare l'integrità dell'organo. Il fegato viene quindi posto in PBS 1X per prepararlo alla perfusione. Da questo momento in avanti tutte le operazioni sono svolte sotto cappa sterile. L'organo è adagiato su una petri sterile del diametro di 10 cm dove viene dapprima perfuso con una siringa sterile contenente PBS 1X (soluzione di lavaggio per eliminare l'eccesso di sangue). Successivamente l'organo viene perfuso con una soluzione di collagenasi 0,6 g/l portata a volume in 50 ml di GBSS contenente tra l'altro  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  a pH 7.5. La piastra viene quindi chiusa e incubata a 37°C e 5% di  $CO_2$  per 1 ora per facilitare l'azione digestiva dell'enzima. Una volta trascorso il tempo di incubazione, sempre sotto cappa si effettua l'omogeneizzazione dell'organo (che risulterà sensibilmente rammollito dall'azione della collagenasi) servendosi di una pipetta. L'omogenato viene filtrato (filtro con maglia con pori di 100 nm di diametro) e diluito con GBSS contenente  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  fino ad arrivare ad un volume finale di 50 ml. Sono state effettuate successive centrifugazioni della sospensione a 50 g per 5' per far precipitare epatociti e cellule a densità maggiore delle HSCs fino a quando non è stato ottenuto un surnatante senza pellet, diluendo 1:1 di volta in volta la sospensione in GBSS. Dopo aver ottenuto una sospensione senza pellet si centrifuga per 10' a 200 g per isolare sul fondo le cellule di interesse. Il pellet

ottenuto (HSCs) viene risospeso in DMEM contenente FBS al 20% e PSG 1%, quindi seminato in fiasche sterili da 75 cm<sup>2</sup>, precedentemente preparate con collagene in acido acetico (0,01M). Dopo 24 ore si lavano le cellule con PBS 1X e si cambia il terreno. Nei giorni successivi, quando le cellule hanno raggiunto un certo grado di confluenza, la percentuale di siero viene abbassata al 10%.



**Figura 11: Studi di immunocitochimica su cellule stellate epatiche (HSCs).** Per verificare che le cellule in coltura siano effettivamente HSCs e saggiarne il grado di purezza, le HSCs sono state trattate con anticorpi specifici per proteine citoscheletriche caratteristiche delle HSC, quindi trattate con anticorpi secondari coniugati a molecole fluorescenti, infine fissate su appositi vetrini e osservate al microscopio a fluorescenza. La figura 11A mostra la colorazione effettuata con anti-GFAP al terzo giorno dopo la semina; in figura 11B si osserva la colorazione anti-GFAP eseguita al sesto giorno dopo la semina. La figura 11C mostra la colorazione anti  $\alpha$ -SMA effettuata al sesto giorno dopo la semina, mentre in figura 11D si osserva la Colorazione anti  $\alpha$ -SMA eseguita al decimo giorno dopo la semina.

**Amplificazione della coltura.** Una volta raggiunta la piena confluenza della fiasca, le HSCs vengono riseminate in due o più fiasche, per rendere possibile l'ampliamento della coltura. A questo scopo si rimuove il terreno, di eseguono 1 o 2 lavaggi con PBS 1X, per eliminare eventuali residui di terreno, e si aggiunge una soluzione di tripsina (0,0125%), enzima proteolitico che consente il distacco delle cellule dal loro supporto, nel caso specifico il collagene. La fiasca

viene incubata a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> per 5 minuti, tempo necessario al distacco. Passato il tempo di incubazione si blocca l'azione proteolitica con un eccesso di terreno al 20% di FBS e le cellule sono raccolte e centrifugate a 100 g per 5', tempo necessario alla precipitazione delle cellule. Il pellet ottenuto viene risospeso in terreno di coltura ed una aliquota viene contata al microscopio ottico mediante la camera di Fuchs-Rosental, per avere una stima del numero totale di cellule della coltura. Sulla base di questa stima, la coltura viene suddivisa in frazioni contenenti un numero di cellule indicativo e idoneo al fine dei diversi esperimenti o alla risemina in altre fiasche per amplificare la coltura. Le HSCs sono utilizzate fino al quinto passaggio in coltura.

**Test di signaling su HSCs quiescenti, attivate e stimolate.** Le HSCs sono seminate su piastre da 24 pozzetti (15x10<sup>3</sup> cellule/pozzetto) e dopo 24 ore vengono incubate in DMEM senza siero per bloccare la crescita. Dopo ulteriori 24 ore di quiescenza, gli eventuali inibitori sono pre-incubati per 30 minuti e successivamente le cellule sono stimolate con l'agonista. Gli stimoli sono eseguiti a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Al termine del tempo di stimolazione, si preleva il terreno e la reazione viene bloccata con Laemmli buffer. I campioni sono sottoposti a SDS/PAGE e successiva rivelazione anticorpale.

**siRNA SHP-1 e SHP-2.** Il silenziamento genico di SHP-1 e SHP-2 tramite siRNA nelle HSCs viene effettuato utilizzando il sistema "Lipofectamine™ RNAiMAX" (Invitrogen). Le cellule (5x10<sup>3</sup>) vengono seminate su piastra da 96 pozzetti in assenza di antibiotici e in presenza di FBS 10%, in modo da avere una confluenza del 30-50% in 24 ore. Il giorno successivo, le HSCs vengono incubate con siRNA (controllo, SHP-1, SHP-2) 10 nM secondo le indicazioni della casa produttrice. Dopo 72 ore le cellule sono sottoposte al test di proliferazione cellulare.

**Test di proliferazione cellulare.** La proliferazione cellulare viene valutata mediante l'utilizzo del Kit "DELFLIA® Cell Proliferation" (PerkinElmer). Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (5x10<sup>3</sup> cellule/pozzetto). Gli eventuali inibitori sono stati pre-incubati per 30 minuti e successivamente le cellule sono state stimolate con l'agonista, in condizioni di 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. 24 ore prima del termine del tempo di stimolazione, viene aggiunta in tutti i pozzetti

(eccetto per il controllo dell'anti-BrdU-Eu) una soluzione di 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Successivamente viene rimosso il terreno dai pozzetti ed è aggiunta una soluzione di fissaggio per 30 minuti a temperatura ambiente. Rimosso anche il fissaggio, le cellule vengono incubate per 2 ore a temperatura ambiente con una soluzione contenente Anti-BrdU-Eu (marcata con Europio). Trascorso il tempo di incubazione, i campioni sono lavati ed incubati infine per 15 minuti con DELFIA Inducer. Alla termine di queste operazioni, la misura della fluorescenza dell'Europio viene rilevata con "VICTOR<sup>3</sup> 1420 Multilabel Counter" (PerkinElmer).

# *Prima parte*





## ***1 I disordini mieloproliferativi***

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

I disordini mieloproliferativi (MPDs) sono delle neoplasie clonali ematopoietiche che riguardano la proliferazione anomala di una o più linee cellulari mieloidi, come ad esempio eritrociti, granulociti e megacariociti (Delhommeau F. et al., 2006; Levine R.L. et al., 2007).

I MPDs sono un gruppo eterogeneo di malattie, se consideriamo l'origine molecolare, il coinvolgimento di specifiche linee cellulari e il decorso clinico; l'Organizzazione Mondiale della Sanità distingue, mediante criteri ben definiti, la Leucemia Mieloide Cronica (LMC), la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (ET) e la Mielofibrosi Idiopatica (MFI). In questo gruppo vengono incluse anche malattie meno frequenti, quali la Leucemia Neutrofila Cronica (LNC), la Leucemia Eosinofila Cronica (LEC), la Leucemia Mielomonocitica Cronica (LMMC) e la Mastocitosi Sistemica (MS) (Vardiman J.W., 2002).

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

L'ematopoiesi incontrollata, caratteristica comune a tutti questi disordini, è clonale nella LMC, nella PV, nella MFI e, in alcuni casi, anche nella ET (Spivak J.L. et al., 2004). La clonalità è considerata un marker per le trasformazioni maligne, ed è stata verificata mediante l'analisi di polimorfismi genetici legati al cromosoma X (Adamson J.W. et al., 1976) ed altri studi citogenetici. È stato dimostrato che effettivamente i progenitori ematopoietici circolanti sono monoclonali nella maggior parte dei pazienti con MPDs, anche se in alcuni casi possono essere policlonali (Ferraris A.M. et al., 1999) oppure la clonalità può riguardare soltanto una singola linea cellulare (El Kasser N. et al., 1997).

La patogenesi dei MPDs coinvolge frequentemente un'attività tirosin chinasi costitutiva, dovuta alla produzione di proteine di fusione o a mutazioni puntiformi.

Tra i MPDs, la Leucemia Mieloide Cronica è stata la prima patologia in cui è stata identificata un'anomalia genetica dovuta alla traslocazione cromosomica ricorrente t(9;22)(q34;q11), definita anche come cromosoma Philadelphia (Ph) e codificante per il primo oncogene responsabile della produzione di una proteina di fusione Bcr-Abl con attività tirosin chinasi costitutiva (Nowell P.C. et al., 1960; Bartram C.R. et al., 1983). Poiché in PV, ET e MFI non è stata riscontrata la presenza del cromosoma Ph, queste patologie vengono comunemente denominate anche MPDs - non LMC (al momento della diagnosi va quindi esclusa come prima cosa la presenza del cromosoma Ph in quanto i sintomi dei MPDs - non LMC sono simili a quelli riportati dai pazienti affetti da LMC).

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

I disordini mieloproliferativi Ph negativi sono di norma difficili da diagnosticare, in quanto le patologie sono asintomatiche e la loro scoperta avviene casualmente in seguito, ad esempio, ad esami emocromocitometrici di routine o al sopraggiungere di complicanze quali trombosi, fenomeni emorragici o tromboemolitici.

Di seguito sono riportati i criteri diagnostici relativi alla PV e alla ET, patologie prese in esame in questa tesi.

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

**Tabella 1: Criteri diagnostici relativi a PV ed ET (Nature 2007, 7: 673-683)**

Benché eterogenee, PV e ET sono accumulate da due caratteristiche fondamentali:

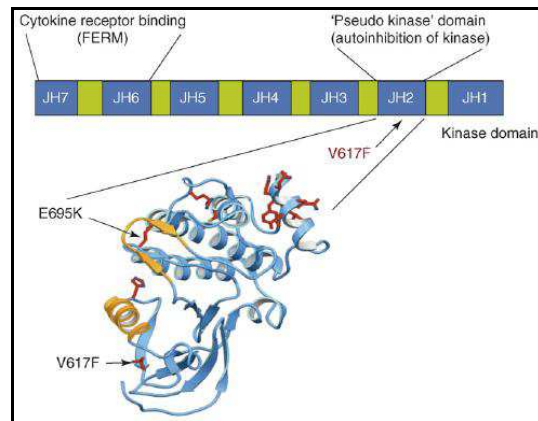
- 1) la formazione di colonie eritroidi endogene (EEC, Endogenous Erythroid Colonies);
- 2) la mutazione ricorrente nella tirosin chinasi non recettoriale JAK2 (Janus Kinase 2).

Nel primo caso cellule di progenitori eritroidi ottenute dal midollo osseo e dal sangue periferico proliferano *in vitro* in colture contenenti siero ed in assenza di Epo (Prchal J.F. and Axelrad A.A., 1974). Approfondimenti successivi hanno dimostrato che non ci sono anomalie nel recettore per l'Epo (Mittelman M. et al., 1996) e che in realtà non si tratta di Epo-indipendenza ma piuttosto di ipersensibilità nei confronti dell'Epo e anche a vari altri fattori di crescita tra cui l'interleuchina 3 (IL-3), il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1) e la trombopoietina (TPO) (Dai C.H. et al., 1992; Correa P.N. et al., 1994). Queste scoperte suggeriscono quindi l'ipotesi che eventi a valle del legame ligando-recettore siano responsabili della formazione di EEC.

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

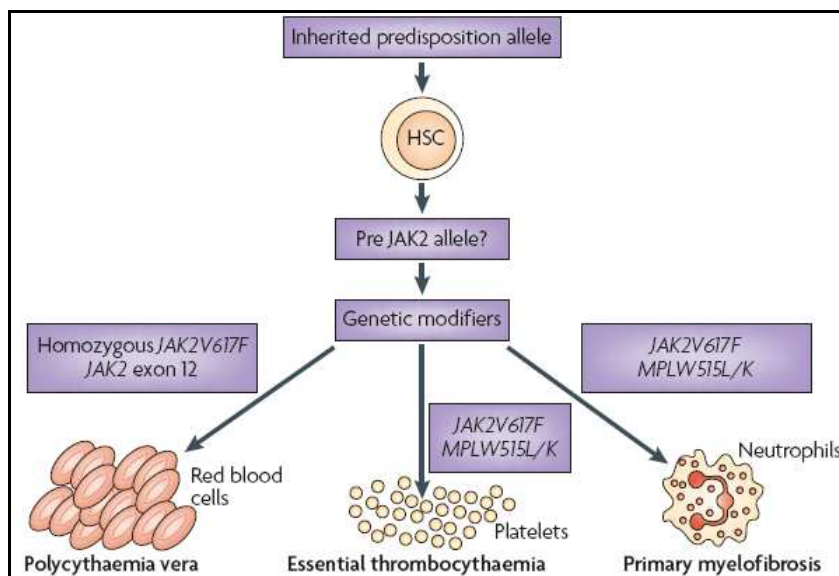
## 1.2 La mutazione di JAK2<sup>V617F</sup> nella PV e nella ET

Nel 2005 molti gruppi, in modo indipendente, hanno identificato una mutazione ricorrente nella tirosin chinasi JAK2 in molti pazienti affetti da PV, ET e MFI.



**Figura 12: Struttura di JAK2; viene evidenziata la mutazione JAK2<sup>V617F</sup>** (*Curr. Opinion Genet. Develop.* 2007; 17: 8-14. 95)

Questa riguarda la sostituzione di una valina per una fenilalanina in posizione 617 nel dominio autoinibitorio JH2 (Figura 12) (Levine R.L. et al., 2005; James C. et al., 2005; Baxter E.J. et al., 2005; Kralovics R. et al., 2005; Zhao R. et al., 2005). La mutazione è presente nelle cellule ematopoietiche ma non nel DNA germinale dei pazienti affetti da MPDs, a sostegno dell'ipotesi che la mutazione sia somatica e che venga acquisita nell'organo deputato all'ematopoiesi (Levine R.L. et al., 2005; Kralovics R. et al., 2005). In particolare, la mutazione è frequente nelle cellule staminali ematopoietiche pluripotenti in quanto le proprietà di rinnovamento delle HSC (Hematopoietic Stem Cell) sono necessarie allo sviluppo del fenotipo dei disordini mieloproliferativi, compatibilmente con una trasformazione indotta da un'attività tirosin chinasi attivata (Figura 13) (Jamieson C.H. et al., 2006).



**Figura 13: Modello corrente della patogenesi della Policitemia Vera, della Trombocitemia Essenziale e della Mielofibrosi Primaria** (*Nature* 2007. 7: 673-683)

La capacità di rinnovamento è invece assente nei progenitori mieloidi. In un primo momento i dati bibliografici disponibili riportavano che, mentre molti pazienti affetti da MPDs erano in condizioni di eterozigosi per l'allele *JAK2*<sup>V617F</sup>, un ristretto numero, solitamente di PV, presentava una situazione di omozigosi per l'allele mutato (Levine R.L. et al., 2005; James C. et al., 2005; Baxter E.J. et al., 2005; Kralovics R. et al., 2005). Studi successivi hanno rivelato che l'omozigosi presente in molti pazienti affetti da PV non è dovuta ad una diminuzione dell'allele wild-type ma piuttosto ad una ricombinazione mitotica e duplicazione dell'allele mutato (Levine R.L. et al., 2005; Kralovics R. et al., 2005). Questo processo viene denominato disomia uniparentale (UPD, uniparental disomy) e coinvolge il locus 9p24, in cui è incluso anche l'allele *JAK2* (Kralovics R. et al., 2005; Kralovics R. et al., 2002).

Mentre l'omozigosi è una caratteristica peculiare della PV, in quanto le EEC derivate dalle cellule di pazienti PV sono in omozigosi per l'allele mutato (Scott L.M. et al., 2006), nella ET la mutazione in omozigosi è più rara; infatti le EEC di pazienti ET sono caratterizzate da alleli wild-type o da *JAK2*<sup>V617F</sup> in eterozigosi (Levine R.L. et al., 2005). Queste scoperte lasciano pensare che esistano delle differenze genetiche tra PV ed ET e che la duplicazione dell'allele mutato sia fondamentale nella patogenesi della PV.

Di seguito è riportata una tabella in cui viene definita la frequenza di mutazione JAK2<sup>V617F</sup> nei differenti disordini mieloproliferativi.

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

**Tabella 2: Percentuale di frequenza della mutazione JAK2<sup>V617F</sup> nei MPDs** (*Nature* 2007. 7: 673-683.)

La mutazione JAK2<sup>V617F</sup> determina un'attivazione costitutiva della chinasi tanto che il mutante espresso in cellule è costitutivamente fosforilato. Questo si traduce in un'attivazione di alcune vie di trasduzione del segnale che includono STAT, MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) e PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt signaling (Levine R.L. et al., 2005; Lu X. et al., 2005). L'espressione dell'allele mutato conferisce alle cellule ematopoietiche sia ipersensibilità che proliferazione autonoma nei confronti delle citochine (Prchal J.F. and Axelrad A.A., 1974). In quest'ultimo caso, la chinasi attivata si lega al recettore in assenza del ligando, inducendo un'attivazione della cascata. Sono tre i principali recettori delle citochine ematopoietiche con cui JAK2 associa: EPO-R (Eritropoietin-Receptor) presente nelle cellule eritroidi; c-Mpl (TPO-R) nei megacariociti; GCSF-R (Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor) presente nei granulociti. La presenza dell'allele mutato potrebbe parzialmente spiegare la differente espressione di questi recettori durante il differenziamento (Levine R.L. et al., 2007).

**In PV ed ET alcuni soggetti possono essere JAK2<sup>V617F</sup>-negativi.** Benché l'allele mutato possa essere presente nella maggior parte dei pazienti affetti da MPDs, un numero significativo di casi ET, MFI e in minor numero PV, sono JAK2<sup>V617F</sup>-negativi. Questi presentano comunque una ematopoiesi clonale, suggerendo l'ipotesi di un'addizionale evento genetico o molecolare coinvolto nella patogenesi dei MPDs (Levine R.L. et al., 2006).

Per quanto riguarda i pazienti PV - JAK2<sup>V617F</sup>-negativi, l'analisi di tutti gli esoni coinvolti nel signaling JAK-STAT (quindi JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, STAT5A e STAT5B) ha identificato quattro nuove mutazioni somatiche nell'esone 12 di JAK2: un nuovo allele per una mutazione puntiforme di sostituzione di una lisina con una leucina al codone 539 (K539L), e tre ulteriori alleli derivati da piccole inserzioni o delezioni che coinvolgono i codoni 538 e 543 (Scott L.M. et al., 2007). In vitro, tutte le cellule dei pazienti caratterizzati da mutazioni all'esone 12 di JAK2 presentano una spontanea proliferazione in EEC con un meccanismo EPO-indipendente ed un'attivazione del signaling simile a quella descritta precedentemente per l'allele mutato JAK2<sup>V617F</sup>. Questi dati indicano che alleli differenti, capaci di attivare JAK2, possono essere associati a differenti fenotipi clinici.

L'analisi dei recettori per le citochine prima citati, ha contribuito ad identificare nei pazienti ET JAK2<sup>V617F</sup>-negativi una mutazione somatica al codone 515 del recettore per TPO, MPL (MPLW515L o MPLW515K) (Pikman Y. et al., 2006; Ding J. et al., 2004). In vitro, l'espressione di MPLW515L induce attivazione di STAT, MAPK e PI3K-Akt in modo analogo all'allele mutato JAK2<sup>V617F</sup>.

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

## ***2 Le piastrine***

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

Le piastrine sono i più piccoli elementi figurati del sangue ed hanno origine nel midollo osseo dai megacariociti. Questi infatti, in seguito ad una proliferazione mitotica non seguita da citodieresi, maturano e rilasciano le piastrine come prodotto finale della protrusione del loro citoplasma. Hanno un diametro di 2-4  $\mu\text{m}$  e sono presenti fisiologicamente ad una concentrazione di  $2-4 \times 10^8$  cellule/ml. Le piastrine sono quindi senza nucleo e senza DNA, ma mantengono piccole quantità di RNA e ribosomi, deputate ad una sintesi proteica comunque scarsa; esse contengono inoltre numerosi organelli citoplasmatici come liposomi e

perossisomi. La loro vita media è di circa 8-10 giorni, al termine della quale vengono rimosse dal circolo sanguigno ad opera delle cellule del sistema reticolo-endoteliale, epatico e splenico. Al microscopio elettronico le piastrine, nello stato inattivo, appaiono di forma discoidale o lenticolare. In seguito ad attivazione subiscono un cambiamento conformazionale, o “shape change”, ed assumono una forma globulare con pseudopodi (figura 14).

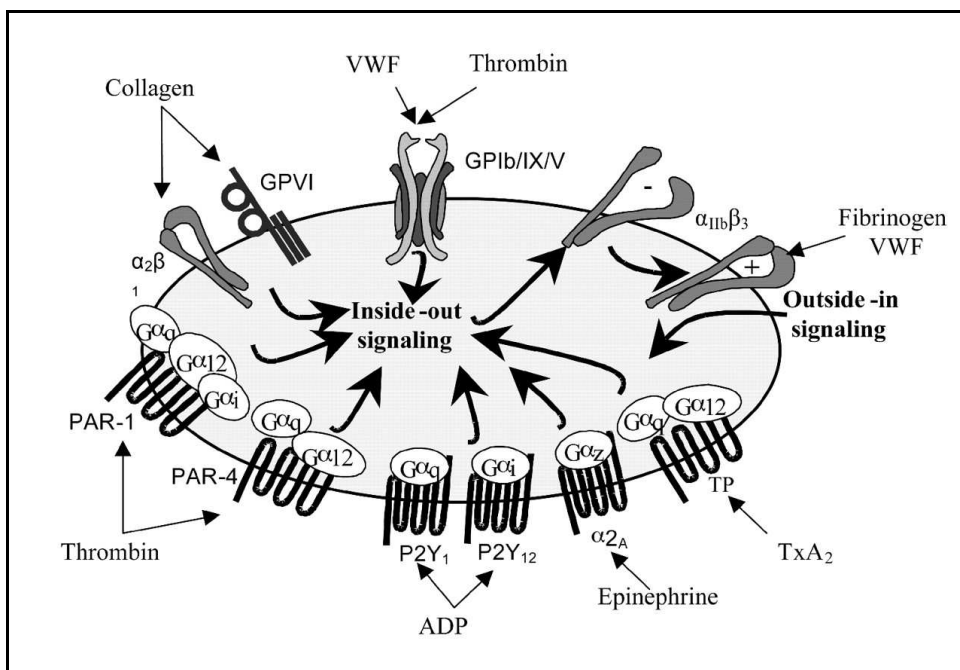


**Figura 14: Piastrine allo stato inattivo e piastrine attivate**

Lo studio ultrastrutturale al microscopio elettronico ha permesso di comprendere la struttura complessa delle piastrine, identificando quattro zone morfologicamente distinte:

- la membrana plasmatica, ricca di proteine importanti nello scambio di informazioni con l'ambiente esterno e nell'interazione delle piastrine tra di loro (aggregazione) o con la superficie sottoendoteliale (adesione). La membrana piastrinica è coperta da numerosi recettori transmembrana (figura 15), incluse molte integrine ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ), recettori con motivi ricchi di prolina (Glicoproteine Ib/IX/V, recettori Toll-like), recettori transmembrana accoppiati alle proteine G (recettori per la trombina, PAR1 e PAR4; recettori per l'ADP, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub>; recettori per il trombossano TXA<sub>2</sub>, TP $\alpha$  e TP $\beta$ ), proteine che appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline (GPVI, Fc $\gamma$ RIIA), recettori per la P-selectina, recettori tirosin chinasi (come i recettori per la trombopoietina) e una serie di altri recettori (Clemetson K.J. and Clemetson J.M., 2007);





**Figura 15: Recettori piastrinici e signalling durante la formazione del trombo** (*Haematologica* 2009.May;94(5):700-11)

- il citoscheletro, costituito da un sistema di microtubuli e filamenti contrattili molto ben sviluppato. Esso forma una speciale impalcatura scheletrica che interviene sia nel mantenimento dell'aspetto discoidale allo stato di riposo, sia nella formazione di pseudopodi durante le prime fasi dell'aggregazione delle piastrine (Bouaziz A. et al., 2007);
- gli organelli citoplasmatici, tra cui si trovano ribosomi, mitocondri, granuli di glicogeno, lisosomi contenenti enzimi ad attività degradativa, numerosi  $\alpha$  granuli e granuli densi ( $\delta$  granuli). In particolare gli  $\alpha$  granuli sono i più numerosi e contengono fattori della coagulazione, come il fibrinogeno e la fibronectina; proteine tra cui il PDGF (Platelet Derived Growth Factor) con funzione mitogena; il fattore piastrinico 4 (PF4) e la  $\beta$ -tromboglobulina, entrambi con azione antieparinica; il fattore di von Willebrand (vWF); e altri. I granuli densi contengono cationi bivalenti ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), serotonina e nucleotidi adenilici (ATP, ADP) che, liberati dopo adeguato stimolo, hanno la funzione di potenziare l'attivazione delle piastrine (Lages B. and Weiss H.J., 1999). In particolare la serotonina, assunta direttamente dal sangue e immagazzinata nei granuli, potenzia notevolmente la risposta aggregante

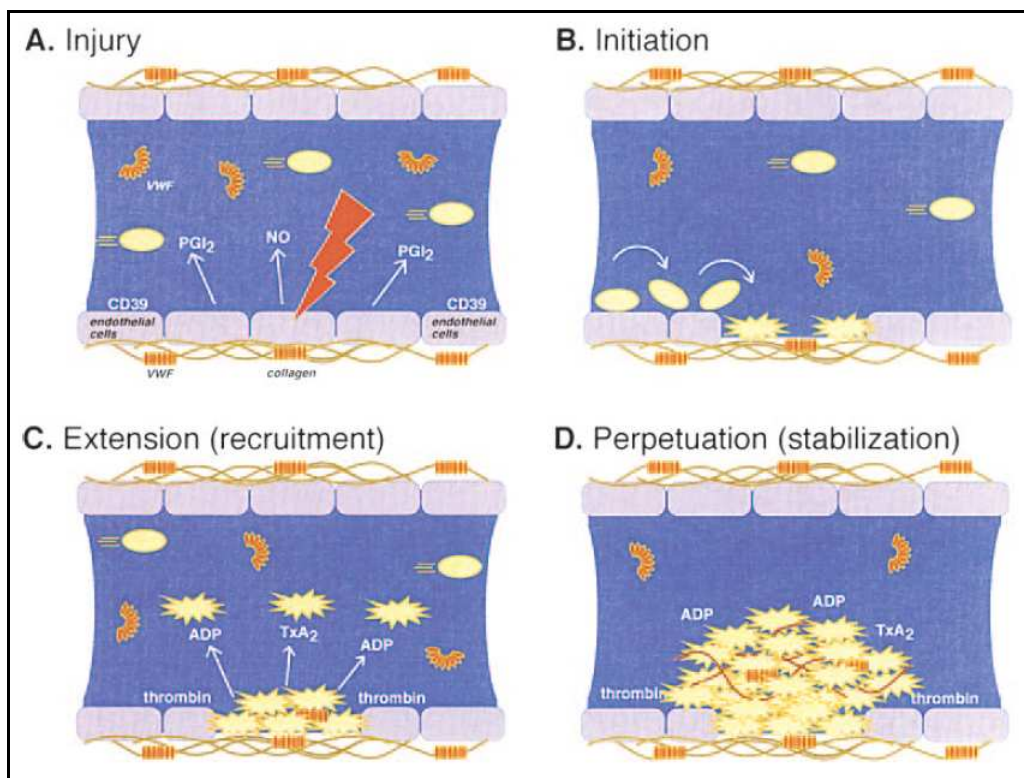
all'ADP (e altri stimoli deboli) e con la sua attività vasocostrittiva facilita il processo dell'emostasi;

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

Le funzioni fisiologiche delle piastrine sono molteplici ma la loro funzione primaria riguarda l'emostasi: essa consiste nell'arresto spontaneo dell'emorragia che si verifica in caso di lesione dell'endotelio o di danno vasale. L'emostasi prevede una serie di eventi che inizia con una vasocostrizione dei vasi sanguigni lesi, cui segue l'attivazione e l'aggregazione delle piastrine con la formazione del tappo emostatico (trombo), la deposizione del reticolo di fibrina all'interno e attorno al coagulo, la retrazione del coagulo, la sua lisi ed il ripristino della parete (Weyrich A.S. and Zimmerman G.A., 2004). L'emostasi e la formazione del trombo sono processi dinamici e gli eventi che li coordinano sono estremamente coordinati da recettori di membrana piastrinici, signaling intracellulare bidirezionale e rilascio di proteine piastriniche e di sostanze infiammatorie (Rivera J. et al., 2009).

## **2.2. Formazione del tappo emostatico: attivazione e aggregazione piastrinica**

La formazione del tappo emostatico in seguito a danno vascolare può essere suddivisa in tre fasi: iniziazione, amplificazione e stabilizzazione (figura 16).



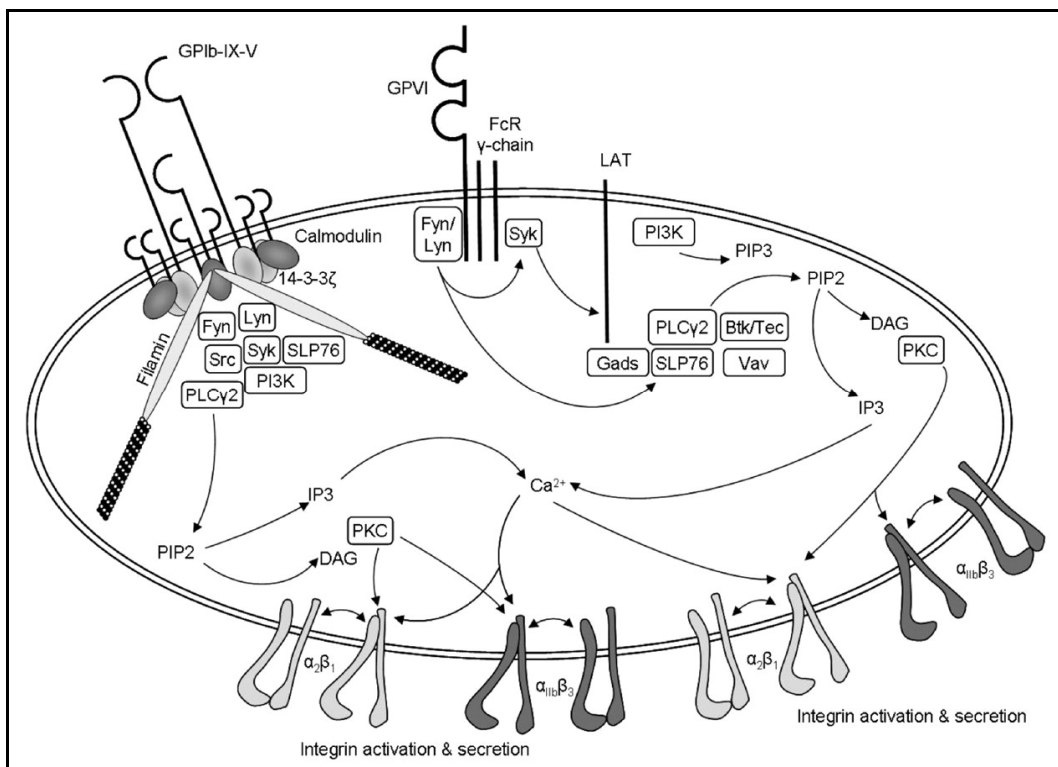
**Figura 16: Fasi della formazione del tappo emostatico** (*Chest. 2003 Sep;124(3 Suppl):18S-25S.*)

Durante la fase di iniziazione si verifica l'arresto delle piastrine in corrispondenza del danno e l'adesione al sottoendotelio esposto ("spreading"); questi eventi sono mediati dal complesso glicoproteina GPIb/IX/V e dai recettori per il collagene, GPVI e  $\alpha_2\beta_1$ , presenti sulla superficie della piastrina e dal fattore von Willebrand (vWF) e dal collagene fibrillare a livello della parete vascolare (Falati S. et al., 2002). Inizialmente solo una piccola parte di piastrine circolanti aderiscono al collagene e vengono attivate; il legame del collagene al recettore GPVI sulla superficie piastrinica causa successivamente il "clustering" sulla membrana plasmatica piastrinica di GPVI e del  $\gamma$ -chain ad esso associato, portando alla fosforilazione del  $\gamma$ -chain da parte delle SFKs e dando luogo a motivi fosfotirosinici riconoscibili da parte della tirosin chinasi Syk e all'attivazione della fosfolipasi C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) (Gross B.S. et al., 1999). PLC $\gamma$ 2 idrolizza PI-4,5-P<sub>2</sub> e produce 1,4,5-IP<sub>3</sub> e diacilglicerolo (DAG), vi è l'aumento della concentrazione di Ca<sup>2+</sup> libera nel citosol delle piastrine adese rilasciato dal sistema tubolare denso e infine l'attivazione della protein chinasi C (PKC). In questa prima fase di attivazione le piastrine vanno incontro allo "shape change" e a diversi processi

che dipendono dalle dinamiche citoplasmatiche dei polimeri di actina: per effettuare lo “spreading”, infatti, le piastrine effettuano una riorganizzazione del loro citoscheletro e assemblano nuovi filamenti di actina (figura 17).

Nella fase di amplificazione, si verifica l'accumulo di piastrine attivate sulla superficie del monostrato iniziale: è qui che ha inizio il fenomeno dell'aggregazione piastrinica. La chiave di questa fase è la presenza sulla superficie delle piastrine di recettori in grado di rispondere rapidamente allo stimolo di agonisti solubili, tra i quali trombina, ADP e TXA<sub>2</sub>. L'accumulo di questi agonisti nella sede del danno permette alle piastrine in circolo di essere reclutate sulla superficie del tappo emostatico in formazione, anche qualora esse non siano state bloccate dal collagene. L'accrescimento della placca piastrinica richiede l'attivazione dell'integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , in un processo noto come “inside-out” signaling, e permette la formazione di una placca stabile costituita da piastrine a contatto attraverso ponti di fibrinogeno e vWF. I recettori coinvolti in questo processo sono tipicamente membri della superfamiglia dei GPCRs, proteine di membrana con una porzione N-terminale extracellulare, una C-terminale intracellulare e sette domini transmembrana. Gli agonisti si legano ai domini accessibili sulla superficie dei GPCRs, causando un cambiamento conformazionale che attiva le proteine G associate con la porzione intracellulare dei recettori (Hamm H.E. et al., 2001). Le proteine G interagiscono con i domini citoplasmatici dei recettori con specificità data in parte dalla sequenza di questi domini e in parte dalla sequenza della subunità  $\alpha$  delle proteine G: le proteine G sono infatti degli eterodimeri composti di subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e nei mammiferi ne esistono quattro famiglie, distinte in base alla subunità  $\alpha$ ; nell'uomo le piastrine esprimono almeno un membro delle G<sub>s</sub> e quattro membri delle G<sub>i</sub> (G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub>, G<sub>i3</sub> e G<sub>i2</sub>), che tra le altre funzioni rispettivamente stimolano e inibiscono la formazione del cAMP da parte dell'adenilato ciclasi. Inoltre le piastrine esprimono uno o più membri della famiglia G<sub>q</sub>, che stimola l'isoforma  $\beta$  della PLC, e due membri della famiglia G<sub>12</sub> (G<sub>12</sub> e G<sub>13</sub>) che intervengono nella regolazione della actina citoscheletrica piastrinica (Offermanns S. et al., 1994; Klages B. et al., 1999; Offermanns S. et al., 1997; Offermanns S. and Simon M.I., 1998; Woulfe D. et al., 2002).

I GPCRs che rispondono agli agonisti piastrinici differiscono per potenza e per le diverse vie di signaling che attivano. Alcuni, come i recettori per la trombina (PAR-1 e PAR-4), TXA<sub>2</sub> (TP) e ADP (P2Y<sub>12</sub>) determinano, mediante l'attivazione delle G<sub>q</sub>, l'idrolisi del fosfoinositolo e l'aumento della concentrazione citosolica di Ca<sup>2+</sup> (Offermanns S. et al., 1997). Altri, come il recettore P2Y<sub>12</sub> per l'ADP e il recettore per l'epinefrina, inibiscono, mediante G<sub>12</sub> o G<sub>z</sub>, l'adenilato ciclasi e attivano la PI-3 chinasi e il membro della famiglia RAS, Rap1 (Yang J. et al., 2002; Yang J. et al., 2000; Jantzen H.M. et al., 2001; Woulfe D. et al., 2002). La migliore attivazione piastrinica indotta dai GPCRs richiede l'attivazione sia del recettore G<sub>q</sub>-coupled che di quello G<sub>i</sub>-coupled (Jin J. and Kunapuli S.P., 1998). La capacità dei membri della famiglia G<sub>i</sub> nelle piastrine di inibire la formazione di cAMP da parte dell'adenilato ciclasi è più rilevante quando la PGI<sub>2</sub> secreta dalle cellule endoteliali ha inibito l'attivazione piastrinica (Yang J. et al., 2002). I recettori per la trombina e per il TXA<sub>2</sub> possono anche determinare il riarrangiamento dell'actina citoscheletrica che sta alla base del cambiamento conformazionale della piastrina mediante G<sub>12</sub> e G<sub>13</sub> (Offermanns S. et al., 1994).



**Figura 17: Signaling piastrinico a partire dalla GPVI e dal complesso GPIb/IX/V** (*Haematologica* 2009.May;94(5):700-11.)

La terza fase nella formazione della placca piastrinica prevede degli eventi che stabilizzano la placca; l'evento meglio descritto è noto con il nome di “outside-in” signaling e coinvolge le integrine, in particolare  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Phillips D.R., 2001). In seguito al legame di questa integrina con degli agonisti, principalmente il fibrinogeno, si verificano una serie di eventi che portano all'accrescimento della placca e alla sua stabilizzazione, tra i quali la riorganizzazione del citoscheletro, la formazione e la stabilizzazione di ulteriori aggregati piastrinici, lo sviluppo di fattori procoagulanti sulla superficie e la retrazione del coagulo: tutto ciò aiuta a rendere più solidi e vicini i contatti tra piastrina e piastrina e ad aumentare la concentrazione degli agonisti solubili (Watson S.P. et al., 2005; Woulfe D. et al., 2004).

### **2.3 Attivazione piastrinica indotta da trombina**

La trombina è una proteasi serinica ed è forse l'attivatore piastrinico più efficiente; essa provoca una serie di risposte nella piastrina tra le quali “shape change”, secrezione, produzione di  $TXA_2$ , mobilizzazione del  $Ca^{2+}$ , fosforilazione proteica e aggregazione. I recettori dell'agonista trombina sono PAR-1 e PAR-4, accoppiati ai membri della famiglia  $G_q$  e  $G_{12}$  e, probabilmente, anche della famiglia  $G_i$ ; essi contengono una sequenza nella regione N-terminale riconosciuta da proteasi: il taglio proteolitico smaschera un nuovo dominio N-terminale che può attivare il recettore tramite interazioni intramolecolari. Successivamente si assiste all'attivazione di PLC $\beta$ , PI3-chinasi e di proteine G monometriche (Rho, Rac e Rap1), all'aumento della concentrazione del  $Ca^{2+}$  citosolico e all'inibizione della formazione di cAMP. Questi processi sono sostenuti dal rilascio di ADP e  $TXA_2$ , che si legano ai rispettivi GPCRs sulla superficie piastrinica.

PAR-1 e PAR-4 rivestono il ruolo primario di recettori per la trombina a livello di piastrine umane ma è possibile che si possano verificare interazioni anche con uno o più membri del complesso GPIb/IX/V, che potrebbe facilitare il taglio proteolitico dei PARs o regolare in qualche modo l'attivazione piastrinica indotta da trombina (Covic L. et al., 2000; Shapiro M.J. et al., 2000).

La stimolazione delle piastrine con trombina che promuove l'attivazione della PLC $\beta$  comporta quindi l'attivazione piastrinica con riorganizzazione del citoscheletro, secrezione dei granuli e aggregazione (Kahn M.L. et al., 1999).

#### **2.4 Attivazione piastrinica indotta da trombopoietina**

La trombopoietina (TPO) è una sostanza umorale descritta per la prima volta nel 1994 come fattore di crescita e di sviluppo dei precursori delle piastrine, i megacariociti. (Kaushansky K., 1995).

Il recettore per la TPO è il c-mpl, un recettore transmembrana, analogo al recettore per l'eritropoietina. L'espressione del c-mpl è risultata essere limitata alle cellule ematopoietiche progenitrici, ai megacariociti e alle piastrine; recenti studi hanno comunque evidenziato una presenza di c-mpl anche nei neutrofilii e nelle cellule endoteliali. (Cardier J.E. and Dempsey J., 1998; Brizzi M.F. et al., 1997).

TPO è in grado di potenziare (o anche iniziare) l'attivazione piastrinica indotta da diversi stimoli, tra i quali trombina, ADP e collagene (Oda A. et al., 1996).

La cascata di signaling a valle del c-mpl meglio caratterizzata è la via del segnale JAK/STAT; TPO può inoltre stimolare la tirosin fosforilazione di molte altre proteine presenti a livello piastrinico, quali Cbl, la subunità p85 della PI3-chinasi, Shc, Vav e cortactina (Sasaki K. et al., 1995; Fontenay-Roupie M. et al., 1998).

#### **2.5 Anomalie piastriniche nei MPDs**

Trombosi ed emorragie sono tra le principali complicanze che affliggono i pazienti con MPDs e potrebbero essere correlate alle varie anomalie piastriniche descritte in queste patologie (Harrison C.N., 2004; Kessler C.M., 2005).

Due prove comunemente utilizzate per valutare la funzionalità piastrinica sono il tempo di coagulazione e gli studi di aggregazione. Il tempo di coagulazione è prolungato in circa il 20% dei pazienti con MPDs, provocando conseguentemente una diminuzione nelle risposte di aggregazione. D'altro canto può verificarsi esattamente l'opposto, ossia si possono osservare risposte potenziate, inclusa l'aggregazione spontanea (Michielis J.J. et al., 2006). In particolare si è vista una diminuzione nelle risposte d'aggregazione in seguito a stimolazione con agonisti quali ADP, adrenalina, collagene e TXA<sub>2</sub>. L'aggregazione anormale non appare

tuttavia correlata alla coagulazione o a eventi trombotici. Inoltre i pazienti con ET hanno generalmente mostrato tendenza ad avere piastrine con una sopravvivenza inferiore alla media.

Alterazioni nell'aggregazione possono essere provocate da una diminuzione dell'espressione di alcuni recettori sulla superficie piastrinica nei pazienti con MPDs. Per esempio si è trovata una sotto-espressione dei recettori per l'adrenalina e per i trombociti (Ushikubi F. et al., 1978; Kaywin P. et al., 1992) ed un'espressione ridotta del recettore per TPO, c-Mpl, è stata riscontrata in pazienti con PV, MFI e ET (Moliterno A.R. et al., 1998). Come conseguenza della ridotta espressione di c-Mpl si verifica una diminuzione della fosforilazione tirosinica in numerose proteine, in seguito a stimolazione con TPO. C'è da sottolineare che questa anomalia riguarda la risposta alla TPO ma non alla trombina, indicando un'alta specificità dei recettori coinvolti. Anche le integrine, tra cui la glicoproteina IIb/IIIa che lega il fibrinogeno, possono presentare anomalie.



### ***3 Obiettivi***

Il ruolo delle piastrine nello sviluppo di complicanze trombotiche in pazienti con disordini mieloproliferativi è stato oggetto di molti studi e sono state descritte numerose anomalie funzionali per queste cellule. La policitemia vera (PV) e la trombocitemia essenziale (ET) sono MPDs clonali caratterizzati da ematopoiesi incontrollata, con aumento rispettivamente della produzione di globuli rossi e piastrine; la complicazione clinica principale in questi due disordini è rappresentata dalla trombosi, anche se in certi casi possono sopraggiungere eventi emorragici. La patogenesi dei MPDs coinvolge frequentemente un'attività tirosin chinasi costitutiva, dovuta alla produzione di proteine di fusione o a mutazioni puntiformi. È stata inoltre identificata una mutazione puntiforme nel dominio pseudochinasi della tirosin chinasi non recettoriale JAK2<sup>V617F</sup>, ed evidenze sperimentali suggeriscono che la mutazione determini una de-regolazione dell'attività di JAK2, compatibile con un aumentato stato di tirosin fosforilazione della chinasi.

In questa prima parte di tesi è stata indagata la risposta alla stimolazione indotta da trombina in piastrine di donatori sani e di pazienti PV ed ET, analizzando la tirosin fosforilazione, lo stato di attivazione di Src e JAK2, eventi coinvolti nella mediazione del segnale trombinico all'interno della piastrina, e alcune risposte funzionali quali aggregazione e rilascio del calcio intracellulare. L'obiettivo è stato quello di valutare se le piastrine di pazienti PV e ET dimostrino una maggiore sensibilità alla trombina rispetto ai sani, dovuto non tanto allo stato mutazionale di Jak2 quanto ad una de-regolazione della tirosin chinasi Src. Inoltre è stato studiato l'espressione e il ruolo della PTP non recettoriale SHP-2 in questo tipo di patologie.

Il lavoro è stato oggetto di pubblicazione (*Blood* 2010, "Src tyrosine kinase preactivation is associated with platelet hypersensitivity in essential thrombocythemia and polycythemia vera; Randi ML, Brunati AM, Scapin M, Frasson M, Deana R, Magrin E, Fabris F, Donella-Deana A.) ed è stato condotto su 13 pazienti con Policitemia Vera e 42 pazienti con Trombocitemia Essenziale, omozigoti o eterozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>, in collaborazione con il gruppo della prof.ssa Maria Luigia Randi e del prof. Fabrizio Fabris.

## 4 Risultati

**Dati clinici.** Nello studio sono stati analizzati 13 PV e 42 ET. Lo sviluppo di principali eventi trombotici in questi pazienti non era correlata con la mutazione di JAK2: infatti sono state riscontrate complicazioni trombotiche nel 58% dei soggetti PV mutati, nel 25% degli ET mutati e nel 33% degli ET wild-type.

Di seguito sono riportate le principali caratteristiche cliniche dei pazienti presi in esame in questa parte di tesi e i dati di laboratorio diagnostico.

	PV	ET
No. of patients	13	42
Sex, male/female	6/7	11/31
Mean age, y	69.3 ± 12.3	58.9 ± 17
Median follow-up duration, y	6.71	4.8
Patients with no thrombosis	6	30
<b>Patients with thrombotic complications</b>	7	12
Thrombotic events arterial	4	8
Thrombotic events venous	3	4
Platelet count, ×10 <sup>9</sup> /L	518 ± 220	746 ± 167
HT ratio	0.43 ± 0.05	0.40 ± 0.04
WBC, ×10 <sup>9</sup> /L	11 ± 4.5	8.8 ± 2
<b>Treatment adopted</b>		
Aspirin alone	1	14
Phlebotomies alone	1	0
HU alone	3	2
Warfarin alone	0	4
Aspirin and HU	7	14
Warfarin and HU	1	1
No therapy	0	7

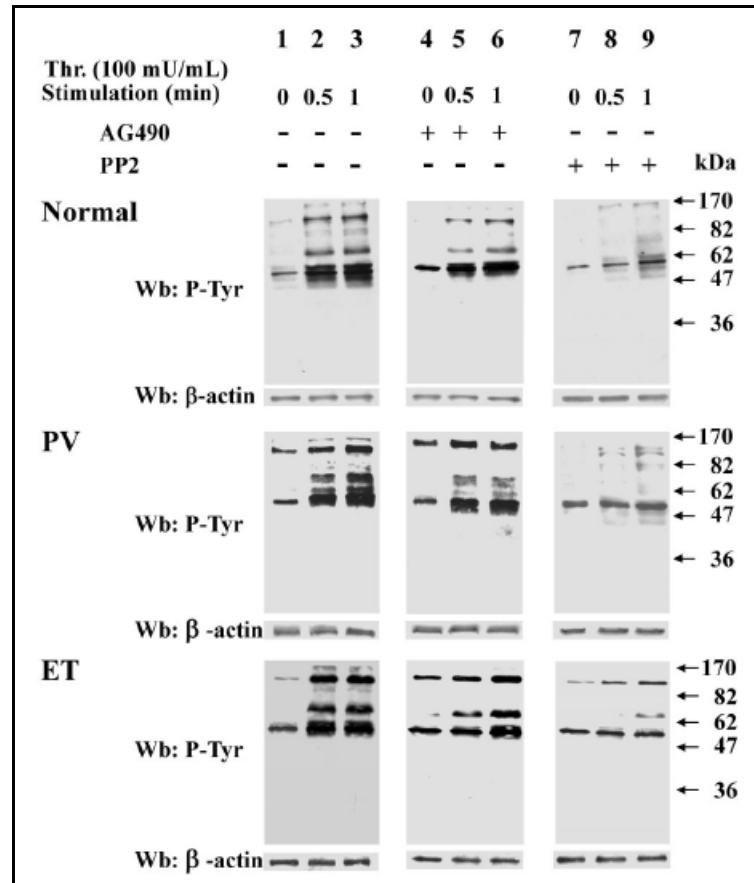
**Tabella 3: Principali parametri clinici e diagnostici dei pazienti con Ph-MPDs analizzati**

I dati riportati si riferiscono al momento in cui i pazienti sono stati presi in esame.

Ph-MPDs sta ad indicare le malattie mieloproliferative Philadelphia-negative; PV la Policitemia Vera; ET la Trombocitemia Essenziale; HT l'ematocrito; HU l'idrossiurea.

**La stimolazione con  $\alpha$ -trombina porta all'attivazione di Src e JAK2 nelle piastrine di pazienti con Ph-MPDs.** Le piastrine lavate di donatori sani o di pazienti con PV o ET sono state stimulate con trombina, agonista che determina una completa protein tirosin fosforilazione nei soggetti PV; la scelta di utilizzare trombina invece che trombopoietina (TPO) è dipesa dal fatto che il recettore cMpl

per la TPO risulta essere assente o espresso in maniera alterata nelle piastrine di individui con Ph-MPDs. L'analisi dei lisati piastrinici con l'anticorpo anti p-Tyr mette in evidenza che la protein tirosin fosforilazione basale è piuttosto debole sia nelle piastrine di sani che in quelle dei pazienti (figura 18 colonna 1).



**FIGURA 18: Analisi della tirosin fosforilazione in piastrine non stimulate e stimulate con trombina isolate dal sangue di donatori e di pazienti con Ph-MPDs.**

Le piastrine sono state ottenute da donatori e da pazienti con PV ed ET, secondo la metodica descritta nei metodi. Le cellule sono state stimulate con trombina (Thr) 100mU/ml per i tempi indicati, in presenza del solo agonista (colonne 1-3) o dopo una pre-incubazione con AG490 10µM (colonne 4-6) o PP2 10µM (colonne 7-9). Le piastrine sono state successivamente lisate e analizzate mediante Western blot con anticorpi anti p-Tyr e β-actina (controllo della quantità proteica) come descritto nei metodi. La figura è rappresentativa degli esperimenti condotti su 20 donatori, 11 PV e 30 ET.

La stimolazione con trombina (100mU/mL) induce un rapido aumento della tirosin fosforilazione di diverse proteine sia nei controlli che nelle piastrine di soggetto con Ph-MPDs (figura 18 colonne 2-3). In presenza di AG490, inibitore di JAK2, si osserva una generale riduzione della tirosin fosforilazione indotta da trombina nei donatori sani, nei pazienti PV e negli ET sia JAK2-mutati che wild-

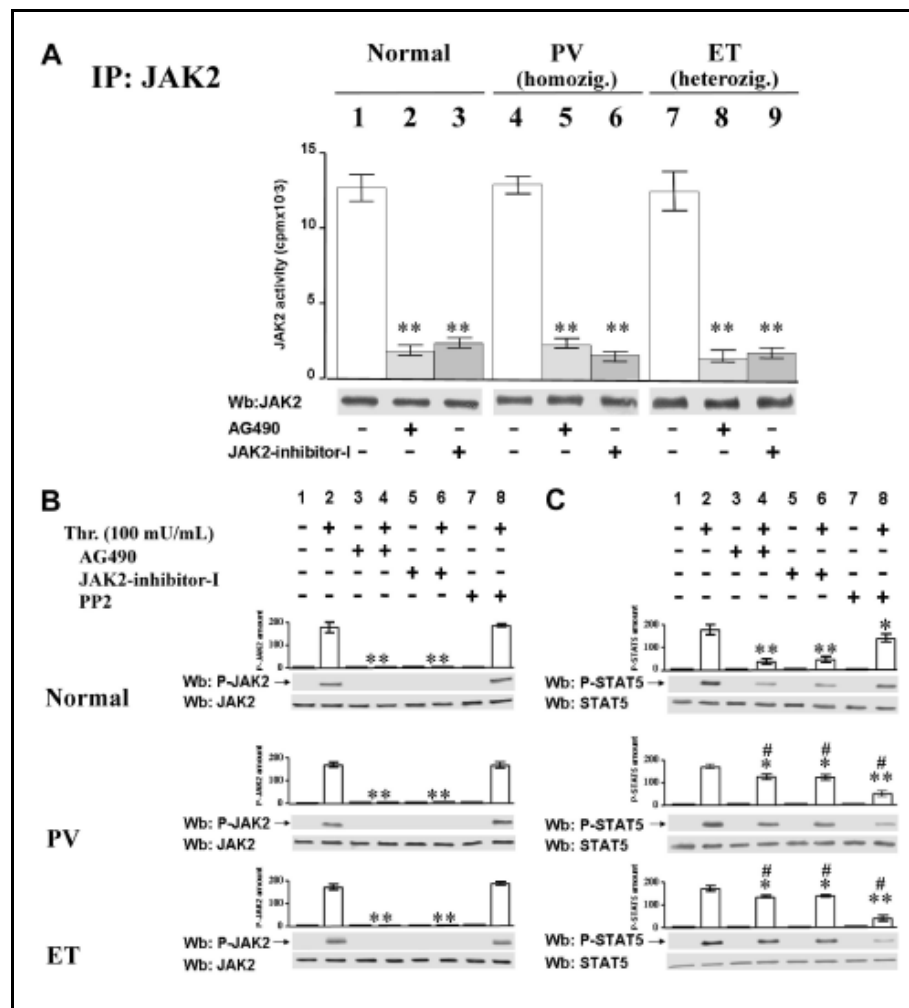
type (figura 18 colonne 5-6). PP2, inibitore specifico di Src, contrasta l'effetto della trombina sia nei sani che nei malati in maniera ancora più efficace rispetto all'AG490 (figura 18 colonne 8-9).

**Le piastrine non stimolate di pazienti con Ph-MPDs contengono una chinasi JAK2 inattiva e una chinasi Src "potenzialmente attiva".** Per chiarire meglio gli eventi tirosin fosforilativi a seguito di stimolazione con trombina nei pazienti con ET o PV, è stato analizzato lo stato di attivazione delle chinasi JAK2 e Src nelle piastrine non stimolate e stimolate.

L'analisi mediante Western blot dell'espressione di JAK2 nei lisati cellulari dimostra che il livello proteico di JAK2 è simile nelle piastrine normali e in quelle patologiche. Per confrontare l'attività specifica delle piastrine di individui wild-type e JAK2-mutati, la chinasi è stata immunoprecipitata nelle piastrine normali contenenti una JAK2 wild-type, nelle piastrine di pazienti con PV omozigoti per JAK2<sup>V617F</sup> e in quelle di ET eterozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>. L'attività in vitro degli immunocomplessi con JAK2 è stata valutata mediante l'utilizzo del substrato poly(Glu/Tyr). La figura 19 A mostra una quantità simile di JAK2 wild-type, di JAK2<sup>V617F</sup> eterozigote o omozigote, con attività chinasica paragonabile; questo sta ad indicare che la mutazione V617F non influenza l'attività catalitica dell'enzima in vitro. L'inibizione dell'attività fosforilativa osservata in presenza dell'inibitore di JAK2 AG490 e dell'inibitore JAK2-inhibitor-I supporta il fatto che l'attività riscontrata è determinata da JAK2 e non da altre tirosin chinasi coimmunoprecipitate.

Lo stato di attivazione di JAK2 è stato analizzato nei lisati piastrinici con Western blot utilizzando l'anticorpo anti-p-JAK2, che riconosce la forma attivata dell'enzima. La forma fosforilata di JAK2 non è stata evidenziata nelle piastrine non stimolate né di sani e né di malati mutati o wild-type (figura 19 B colonna 1). Lo stimolo con trombina porta ad una fosforilazione di JAK2 in tutti i campioni (figura 19 B colonna 2). La preincubazione con AG490 o con JAK2-inhibitor-I annulla l'attivazione di JAK2 (figura 19 B colonne 2,4,6), mentre PP2 non influenza significativamente la fosforilazione chinasica (figura 19 B colonne 2,8). A conferma che sia i wild-type che i JAK2-mutati non sono costitutivamente attivi nelle piastrine non stimolate di Ph-MPDs, è stata analizzata la fosforilazione di

STAT5, il principale substrato di JAK2, mediante Western blot utilizzando un anticorpo che riconosce la forma fosforilata di STAT5 a livello della Tyr694 (anti-p-STAT5). Nelle piastrine non stimolate non vi è fosforilazione di STAT5 nei donatori sani e nei pazienti mutati o wild-type ma risulta evidente in entrambi i casi dopo stimolazione con trombina (figura 19 C colonne 1-2).



**FIGURA 19: Analisi dello stato di attivazione di JAK2 in piastrine non stimolate e stimolate con trombina.**

A) Attività tirosin chinasic di soggetti wild-type o JAK2<sup>V617F</sup>. Le piastrine ottenute da donatori (colonne 1-3), pazienti PV omozigoti per JAK2<sup>V617F</sup> (colonne 4-6) e pazienti ET eterozigoti per JAK2<sup>V617F</sup> (colonne 7-9) sono state lisate e immunoprecipitate con l'anticorpo anti-JAK2. L'attività di JAK2 negli immunocomplessi è stata valutata in vitro utilizzando il substrato PolyGlu<sub>4</sub>Tyr in presenza di [<sup>33</sup>P]ATP e senza inibitori (colonne 1,4,7) o in presenza anche di inibitori: AG490 10μM (colonne 2,5,8), o JAK2-inhibitor-I 1μM (colonne 3,6,9). I campioni sono stati sottoposti a SDS/PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa ed è stata analizzata la radioattività incorporata nel substrato polyGlu<sub>4</sub>Tyr mediante Packard Cyclone; in seguito è stata effettuata la rivelazione anticorpale con l'anticorpo anti-JAK2 (Wb in figura). Gli esperimenti con AG490 e PP2 sono stati eseguiti su 8 donatori, 5 PV omozigoti per JAK2<sup>V617F</sup> e 7 ET eterozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>. Gli esperimenti con AG490, JAK-inhibitor-I e PP2 sono stati effettuati su 4 donatori, 3 PV omozigoti per JAK2<sup>V617F</sup> e 4 ET eterozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>. \*\*P<0.001 vs l'attività

di JAK2 testata in assenza di inibitori. B-C) Le piastrine isolate di donatori e pazienti PV o ET sono state trattate in assenza (colonne dispari) o in presenza (colonne pari) di trombina 100 mU/ml per 1 minuto in assenza (colonne 1-2) o presenza di AG490 10  $\mu$ M (colonne 3-4), o di JAK2-inibitor-I 1  $\mu$ M (colonne 5-6), o di PP2 10  $\mu$ M (colonne 7-8). B) I lisati piastrinici sono stati analizzati mediante Western blot con l'anticorpo anti-p-JAK2 che riconosce la forma attivata della chinasi e poi con anti-JAK2. C) I lisati piastrinici sono stati analizzati mediante Western blot con l'anticorpo anti-p-STAT5 e con l'anti-STAT5. I valori della significatività densitometrica sono riportati sotto le relative bande di p-JAK2 (B) o p-STAT5 (C). Gli esperimenti nei pannelli B e C sono stati eseguiti su 12 donatori, 8 PV (omozigoti ed eterozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>) e 15 ET. Gli esperimenti con JAK-inibitor-I sono stati effettuati su 4 donatori, 3 PV omozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>, e 4 ET eterozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>. B) \*\*P<0.001 vs p-JAK2 in assenza di inibitori di JAK2. C) \*\*P<0.001 e \*P<0,01 vs p-STAT5 in assenza di inibitori. #P<0.001 PV ed ET vs piastrine di donatore.

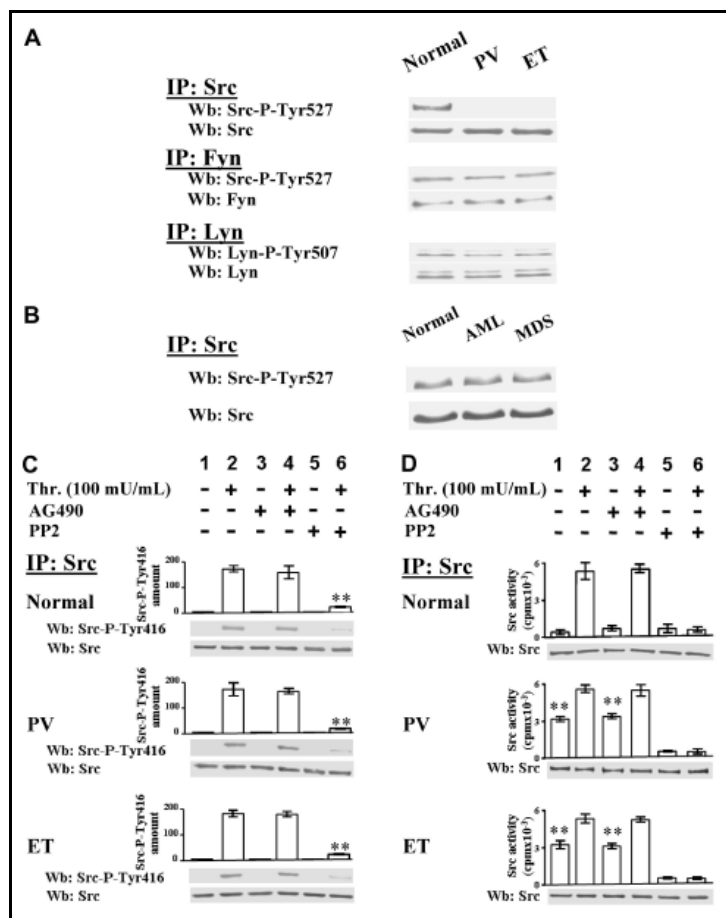
Poiché è stata descritta una via di fosforilazione alternativa di STAT5 dipendente dalle chinasi della famiglia Src ma indipendente da JAK2, è stato valutato il contributo individuale delle chinasi JAK2 e Src sullo stato fosforilativo di STAT5, preincubando le piastrine con gli inibitori di JAK2 (AG490 e JAK2-inibitor-I) o con gli inibitori di Src (PP2 e SU6656). Mentre AG490 e JAK2-inibitor-I riducono fortemente (rispettivamente dell'80% e del 75%) la fosforilazione di STAT5 indotta dalla trombina nei donatori sani, essi non sono così efficaci nelle piastrine di Ph-MPDs (meno del 27%) (figura 19 colonne 2,4,6). Al contrario, il trattamento con PP2 causa un'inibizione di solo circa il 26% della fosforilazione di STAT5 nelle piastrine di soggetti sani, mentre riduce fortemente la fosforilazione di questa proteina nei campioni patologici (figura 19 C colonne 2,8). L'inefficacia di PP2 sulla fosforilazione di JAK2 (figura 19 B colonne 2,8) esclude l'ipotesi di una inibizione aspecifica di PP2 sull'attività chinastica di JAK2. Risultati analoghi sono stati ottenuti utilizzando l'inibitore di Src SU6656.

Successivamente è stato analizzato lo stato di attivazione di tre SFKs, cioè Src, la più espressa nelle piastrine, Fyn e Lyn. Queste chinasi, che si ritrovano espresse con un analogo livello proteico nelle piastrine normali e nei pazienti, sono state immunoprecipitate a partire dai lisati cellulari e analizzate mediante Western blot con gli anticorpi fosfo-specifici che riconoscono la loro fosfotirosina C-terminale (anti Src-p-Tyr527 per Src e Fyn e anti-p-Tyr507 per Lyn). Nelle piastrine di donatori sani tutte le SFKs cross-reagiscono con i loro rispettivi anticorpi fosfo-specifici (figura 20 A), in accordo con i risultati per i quali, nelle cellule non stimolate, le SFKs sono presenti nella loro conformazione inattiva a causa delle

interazioni intramolecolari della fosfotirosina C-terminale con il *Src homology 2 domain*. Gli anticorpi fosfo-specifici interagiscono anche con Fyn e Lyn immunoprecipitati dalle piastrine di soggetti PV ed ET, ma inaspettatamente non con Src immunoprecipitata, a riprova che la Tyr527 di Src non è fosforilata nelle piastrine di malati (figura 20 A). Interessante è notare come nelle piastrine ottenute da piastrine con leucemia mieloide acuta (AML) o sindromi mielodisplastiche (MDSs) Src sia normalmente fosforilata in Tyr527 (figura 20 B).

È stata valutata quindi l'autofosforilazione di Src in Tyr416, che porta la chinasi ad assumere la conformazione “iperattiva”. Nonostante gli immunoprecipitati di Src non interagiscano con gli anticorpi anti-Src-p-Tyr416 nelle piastrine non stimolate sane o patologiche (figura 20 C colonna 1), lo stimolo con trombina causa la fosforilazione di Src-Tyr416 in tutti i casi; il processo non è influenzato da l'AG490 ma è quasi interamente inibito da PP2 (figura 20 C colonne 2,4,6,).

In seguito è stata valutata l'attività chinastica in vitro di Src immunoprecipitata da piastrine normali e di pazienti con Ph-MPDs. In accordo con la conformazione “chiusa” di Src dipendente dalla fosforilazione della tirosina in posizione 527 (figura 20 A), l'enzima presente nelle piastrine non stimolate di soggetti sani dimostra una bassa attività chinastica, mentre la chinasi Src piastrinica di origine patologica presenta una sostanziale attività in vitro (figura 20 D colonna 1), a conferma della conformazione di Src potenzialmente attiva con la defosforilazione sia della tirosina 527 inibitoria che di quella attivatoria in posizione 416 (figura 20 A,C). L'attività di Src aumenta drasticamente nelle piastrine normali stimolate con trombina (maggiore di 12 volte), mentre nelle piastrine stimolate nello stesso modo di individui con Ph-MPDs aumenta di solo 2 volte (figura 20 D colonne 1-2). Successivamente, l'attività di Src indotta dall'agonista raggiunge quasi livelli simili sia nelle piastrine normali che in quelle patologiche (figura 20 D colonna 2). Il risultato che evidenzia come il pretrattamento con AG490 delle piastrine non influenzi né l'autofosforilazione di Src (figura 20 C lanes 2,4), né la sua attività (figura 20 D colonne 2,4), dimostra che l'attivazione della chinasi indotta dalla trombina è indipendente dall'attività di JAK2.



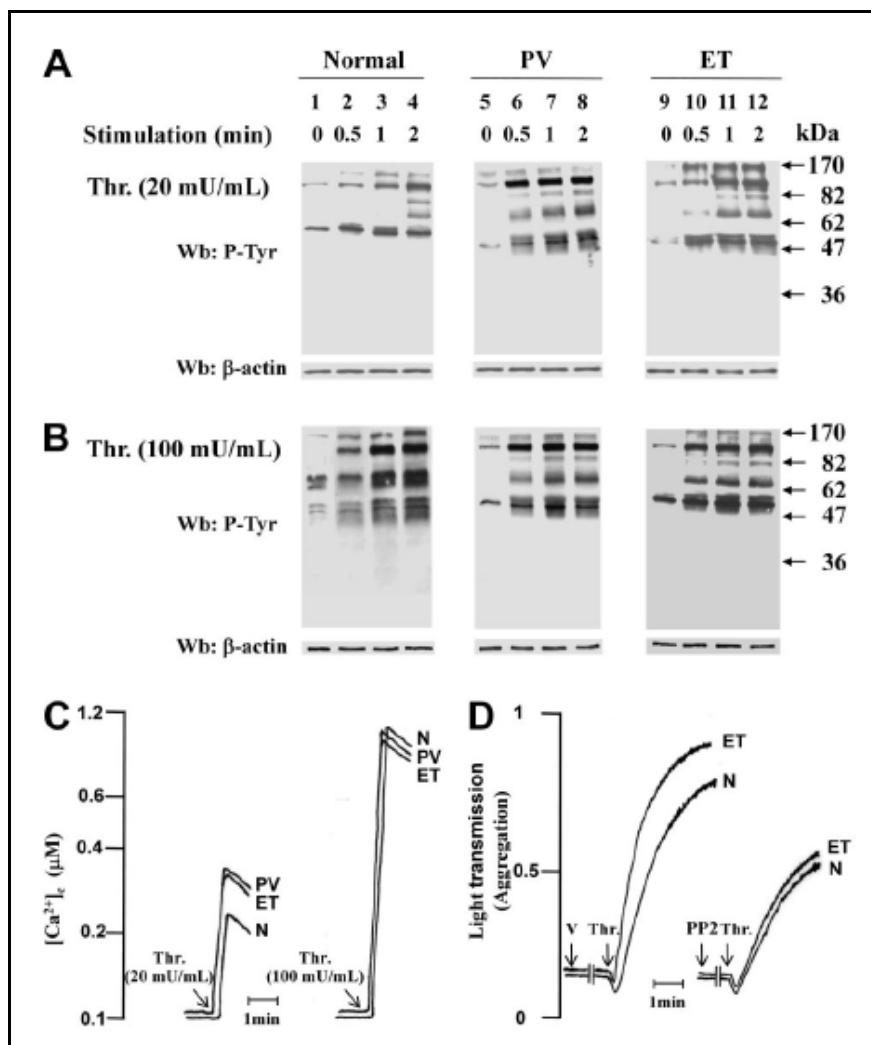
**FIGURA 20: Analisi dello stato di attivazione di Src in piastrine non stimolate e stimolate con trombina.**

A) Le piastrine isolate da donatori e pazienti PV ed ET sono state lisate e immunoprecipitate con anticorpi anti-Src, anti-Fyn o anti-Lyn. Gli immunoprecipitati con Src e Fyn sono stati testati mediante rivelazione anticorpale con anti-Src-p527, che riconosce la forma fosforilata C-terminale di entrambe le chinasi e successivamente con anti-Src e anti-Fyn. Gli immunoprecipitati con Lyn sono stati testati invece con anti-Lyn-p-Tyr507 e anti-Lyn. I Western blot di immunoprecipitati Src sono rappresentativi di esperimenti effettuati su 14 donatori, 10 PV (eterozigoti o omozigoti per  $JAK2^{V617F}$ ) e 18 ET  $JAK2^{V617F}$  negativi e positivi; i Western blot di immunoprecipitati con Fyn e Lyn sono stati eseguiti su 4 donatori e 4 ET. B) Src è stata immunoprecipitata da lisati piastrinici di 5 donatori, 3 pazienti AML e 5 pazienti MDS. Gli immunoprecipitati con Src sono stati testati con Western blot e rivelazione anticorpale con anti-Src-pTyr527 e anti-Src. C-D) Le piastrine isolate di donatori, pazienti PV ed ET sono state incubate in assenza (colonne 1,3,5) o in presenza di trombina 100mU/ml (colonne 2,4,6) per 1 minuto, in assenza (colonne 1-2) o in presenza di AG490 10  $\mu$ M (colonne 3-4) o PP2 10  $\mu$ M (colonne 5-6). Le piastrine sono state poi lisate e immunoprecipitate poi con anti-Src. C) Gli immunoprecipitati con Src sono stati analizzati mediante Western blot con anti-Src-p-Tyr416. I valori della significatività densitometrica sono riportati sotto le relative bande di anti-Src-p416.  $**P < 0,001$  vs anti-Src-pTyr416 presente nelle piastrine stimolate in assenza di inibitori. D) Gli immunoprecipitati con Src sono stati analizzati per quanto riguarda l'attività in vitro sul peptide substrato Src-specifico cdc2 (6-20, come descritto nei metodi). I campioni sono stati sottoposti a SDS/PAGE e i gel sono stati analizzati per quanto riguarda la radioattività incorporata nel peptide mediante Packard Cyclone (colonne del pannello). I gel sono stati poi blottati ed è stata eseguita la rivelazione anticorpale con anti-Src. I pannelli C e D sono rappresentativi di esperimenti eseguiti su 12 donatori, 10 PV (eterozigoti o omozigoti per  $JAK2^{V617F}$ ) e 18 ET  $JAK2^{V617F}$  negativi o positivi.  $**P < 0,001$  vs piastrine di donatore non stimolate.



**Le piastrine di Ph-MPDs sono altamente sensibili alle basse concentrazioni di trombina.** Poichè le piastrine non stimolate di Ph-MPDs contengono una chinasi Src potenzialmente attiva, è stata valutata la loro risposta in seguito a stimoli relativamente deboli. A tal scopo le piastrine sono state stimolate con basse concentrazioni di trombina (21 mU/mL), le quali evocano una più rapida tirosin-fosforilazione nelle piastrine di Ph-MPDs che in quelle sane (figura 21 A). Infatti nelle cellule di controllo la tirosin-fosforilazione di alcune proteine aumenta gradualmente nei 2 minuti dopo stimolo con trombina, mentre sia nei campioni di PV ed ET diverse bande relative a tirosin-fosforilazione sono molto evidenti già dopo 30 secondi. Le differenze nei tempi di comparsa delle bande di tirosin-fosforilazione tendono a diminuire incrementando la concentrazione dello stimolo usato, come si vede in figura 21 B, dove è stata utilizzata la trombina 100 mU/mL.

La mobilizzazione del  $Ca^{2+}$  intracellulare rappresenta un evento a monte della cascata dell'attivazione piastrinica; è stata quindi valutata la differenza nell'aumento del  $[Ca^{2+}]_c$  citosolico nelle piastrine normali o di pazienti utilizzando come stimolo diverse concentrazioni di trombina. Interessante è stato riscontrare che basse concentrazioni di trombina (20mU/mL) determinano un aumento di  $[Ca^{2+}]_c$  nelle piastrine di PV ed ET di circa due volte superiore rispetto alle piastrine di individui sani (figura 21 C). Diversamente, l'aumento determinato da concentrazioni superiori di trombina (100 mU/mL) nei pazienti è inferiore rispetto ai sani (figura 21 C). Inoltre l'aggregazione, evento a valle dell'attivazione piastrinica, determinata da basse concentrazioni di trombina (21 mU/mL) è più rapida e consistente (72% circa) negli ET rispetto ai sani (figura 21 D), a conferma dell'ipersensibilità delle cellule di Ph-MPDs. Il coinvolgimento della preattivazione di Src negli eventi successivi è supportato dal fatto che l'inibizione dell'aggregazione piastrinica determinata da PP2 è maggiore nelle piastrine di pazienti con ET rispetto ai soggetti sani (circa 65% vs 40% circa) (figura 21 D).



**FIGURA 21: Analisi della tirosin fosforilazione, dell'aumento del Calcio citosolico e dell'aggregazione indotti da una bassa concentrazione di trombina nelle piastrine di donatori e di pazienti.**

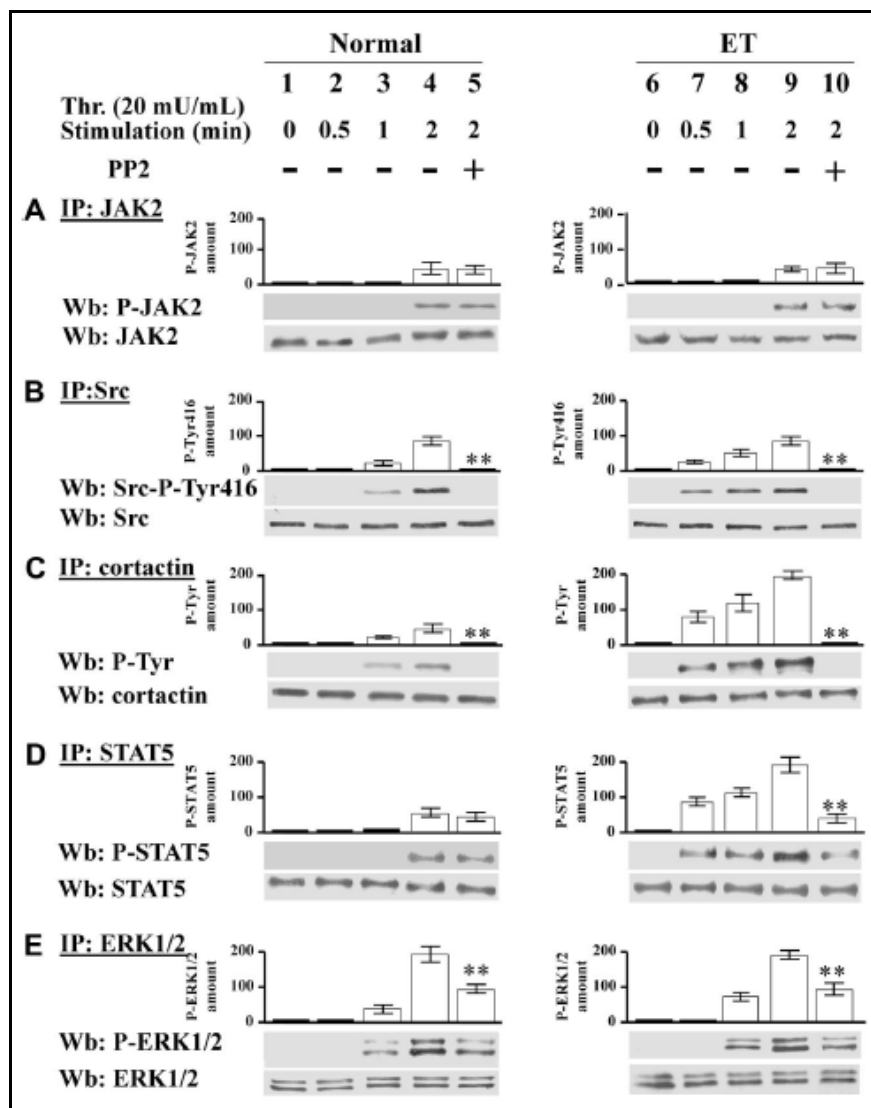
A-B) Le piastrine di donatori (colonne 1-4) e pazienti PV (colonne 5-8) o ET (colonne 9-12) sono state stimolate con 20 mU/ml (A) o 100 mU/ml (B) di trombina per i tempi indicati. Le cellule sono state poi lisate e analizzate mediante Western blot con anticorpi anti pTyr e anti-βactina. C) L'aumento di  $[Ca^{2+}]_i$  determinato da trombina 20 mU/ml o 100mU/ml è stato valutato mediante il protocollo descritto nei metodi. I traccianti in figura sono rappresentativi di esperimenti eseguiti su 10 normali, 7 PV e 10 ET JAK2<sup>V617F</sup> negativi o positivi. D) L'aggregazione è stata determinata mediante il protocollo descritto nei metodi, in piastrine non pre-trattate o pre-trattate con PP2 e successivamente stimolate con trombina 20 mU/ml. I traccianti sono rappresentativi di esperimenti effettuati su 4 donatori e 4 ET.

Come dimostrato precedentemente in figura 18, la protein tirosin fosforilazione provocata da una concentrazione di trombina relativamente elevata (100 mU/mL) nelle piastrine di Ph-MPDs è attribuibile maggiormente alla chinasi Src rispetto alla JAK2. Per determinare il contributo specifico di queste chinasi tirosiniche alle basse concentrazioni di agonista, è stato analizzato il tempo di attivazione di Src e JAK2 in piastrine di donatori sani e di pazienti ET in seguito a stimolo con

trombina 20 mU/mL. In entrambi i casi l'attivazione di JAK2, analizzata con l'anti-p-JAK2, diventa evidente dopo 2 minuti di stimolo (figura 22 A colonne 1-4, 6-9). Il tempo di attivazione di Src, invece, è diverso tra piastrine normali e patologiche. Nei controlli infatti l'attivazione di Src, valutata mediante l'autofosforilazione di Src-Tyr416 e la fosforilazione in tirosina di cortactina, un substrato di Src, risulta chiara dopo 1 minuto di stimolo (figura 22 B-C colonne 1-4), mentre nelle cellule patologiche l'attivazione di Src è già evidente dopo 30 secondi di trattamento con trombina (figura 22 C colonne 6-9).

La fosforilazione di STAT5 è concomitante con l'attivazione di JAK2 nelle piastrine di donatore sano mentre, analogamente all'attivazione di Src, è più rapida nei soggetti con Ph-MPDs (figure 22 D colonne 1-4, 6-9). Inoltre, in presenza dell'inibitore Src PP2, la fosforilazione di Src-Tyr416 e di cortactina non si verifica né nei sani né nei pazienti (figura 22 B-C colonne 4-5, 9-10) e la fosforilazione di STAT5 diminuisce drasticamente solo nelle piastrine di ET (figura 22 D colonne 4-5, 9-10).

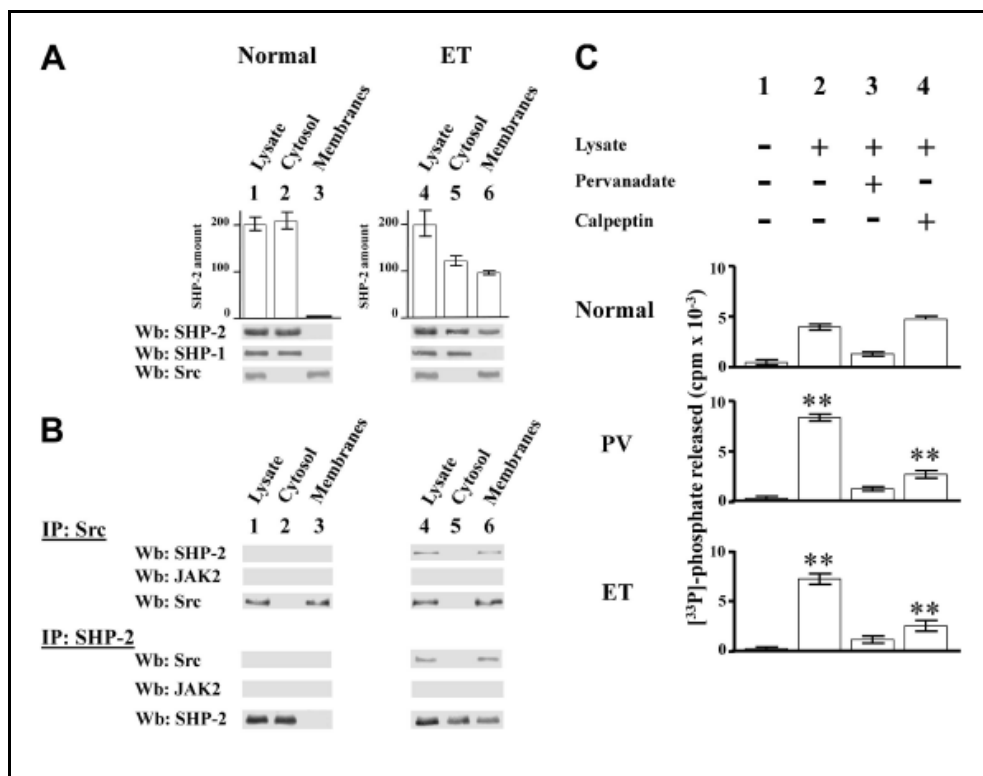
Successivamente è stato anche analizzato lo stato fosforilativo di ERK1/2 poiché è nota l'associazione tra una attivazione costitutiva di ERK e la mutazione di JAK2 nei precursori della linea eritroide dei PV. In mancanza di una attivazione basale di JAK2, non vi è fosforilazione di ERK1/2 nelle piastrine non stimolate di donatori sani e di ET (sia wild-type che mutati; figura 22 E colonne 1,6). La fosforilazione di ERK1/2 determinata da trombina precede l'attivazione di JAK2 e dipende circa per il 50% dall'attività di Src, sia nei controlli che nei campioni patologici, come si deduce dall'effetto inibitorio di PP2 (figura 22 E colonne 4-5, 9-10).



**FIGURA 22: Tempo di attivazione del signaling relativo a JAK2 e Src indotto da 20 mU/ml di trombina**

A-E) Piastrine di donatore (1-5) o di pazienti con ET (6-10) sono state stimulate con 20 mU/ml di trombina per i tempi indicati in assenza (colonne 1-4, 6-9) o in presenza di PP2 10  $\mu$ M (colonne 5-10). A) Le piastrine sono state lisate e immunoprecipitate con anticorpo anti-JAK2 e gli immunoprecipitati sono stati sottoposti a SDS/PAGE, blottati e rivelati con anti-p-JAK2 e anti-JAK2. B) I lisati piastrinici sono stati immunoprecipitati con anti-Src e gli immunocomplessi sono stati sottoposti a rivelazione anticorpale con anti-Src-p-Tyr416 e anti-Src. C) I lisati piastrinici sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-cortactina e gli immunoprecipitati sono stati analizzati con anti-pTyr e anti-cortactina. D) Gli immunoprecipitati ottenuti con l'anticorpo anti-p-STAT5 sono stati testati con anti-p-STAT5 e anti-STAT5. E) Gli immunoprecipitati ottenuti con l'anticorpo anti-ERK1/2 sono stati trattati con l'anti-p-ERK1/2 e anti-ERK1/2. I valori della significatività densitometrica sono riportati sotto le relative bande di fosforilazione. I pannelli A, C e D sono rappresentativi di esperimenti effettuati su 12 donatori e 16 ET JAK2<sup>V617F</sup> negativi o positivi, mentre i pannelli B ed E sono rappresentativi di esperimenti eseguiti su 6 donatori e 6 ET JAK2<sup>V617F</sup> negativi o positivi. \*\*P < 0,001 vs la relativa tirosin fosforilazione rilevata dopo 2 minuti di stimolazione con trombina in assenza di PP2.

**La tirosin fosfatasi SHP-2 è attivata e reclutata dalle SFKs in piastrine non stimolate di pazienti con Ph-MPDs.** Nelle piastrine non stimolate dei pazienti, le SFKs assumono una conformazione “potenzialmente attiva” essendo defosforilate nella tirosina inibitoria 527. Per chiarire i meccanismi responsabili di questa conformazione chinastica anomala che si verifica in assenza di stimoli esogeni, è stata analizzata l’espressione di Csk, la tirosin chinasi che catalizza la fosforilazione della Tyr527; i risultati non hanno mostrato differenze tra il livello proteico di Csk nei soggetti normali rispetto ai pazienti. Successivamente sono state analizzate le tirosin fosfatasi SHP-1 e SHP-2, che sono state viste essere coinvolte nella defosforilazione della tirosina 527 di Src e rivestono un ruolo critico nello sviluppo e nella funzionalità della cellule ematopoietiche. Generalmente SHP-1 e SHP-2 si trovano in una conformazione chiusa auto inibita a livello del citosol di cellule non stimolate; la loro attivazione richiede l’apertura della struttura e il loro reclutamento a livello dei substrati tirosin fosforilati. La distribuzione cellulare e l’attività di queste tirosin fosfatasi sono state analizzate nelle piastrine non stimolate di soggetti normali e di pazienti con Ph-MPDs. Come ci si aspettava, mentre la presenza di SHP-2 è stata rilevata solo nel citosol delle cellule normali (figura 23 A, colonne 2,3), un’aliquota di fosfatasi è ancorata alle membrane delle piastrine degli ET (figura 23 A, colonne 5,6). Altri esperimenti hanno dimostrato che SHP-1 è presente solo nel citosol di cellule sia normali che di pazienti (figura 23 A, colonne 2,3 e 5,6). Per esaminare il possibile verificarsi di una interazione tra SHP-2 e una chinasi Src nelle piastrine di ET, sono stati effettuati esperimenti di coimmunoprecipitazione utilizzando sia anticorpi anti-Src che anti-SHP-2. Nelle piastrine normali, la SHP-2 citosolica non interagisce con la chinasi Src (figura 23 B, colonne 1,3), che si localizza nella frazione membranosa (figura 23 A, colonne 2,3). Al contrario, nelle cellule patologiche SHP-2, presente in maniera anomala anche nelle membrane dove si trova solitamente Src (figura 23 A, colonna 6), coimmunoprecipita con la chinasi (figura 23 B, colonna 6). Le evidenze che JAK2 non è rilevabile in immunoprecipitati di Src e di SHP-2 stanno ad indicare che questa proteina non è necessaria per l’associazione Src-SHP-2 (figura 23 B).



**FIGURA 23: Analisi dell'attività basale di SHP-2 e sua interazione con Src nelle piastrine di donatori e pazienti ET.**

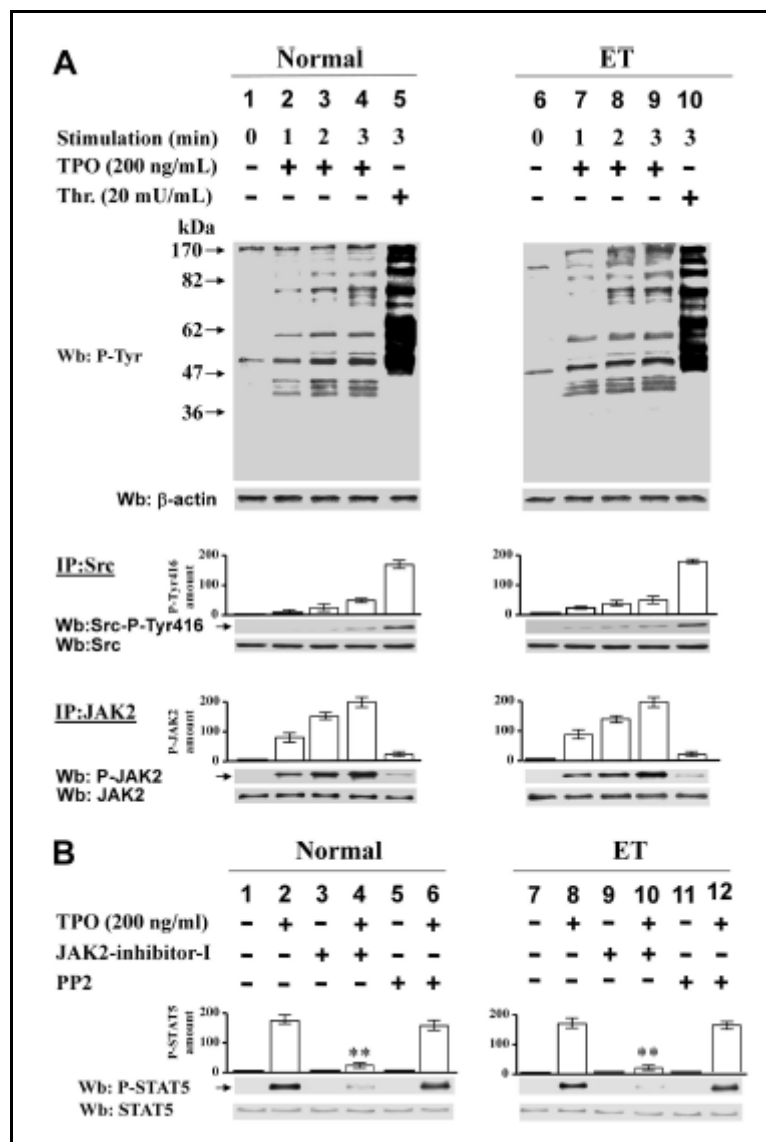
A-B) Le piastrine di donatori (colonne 1-3) o di pazienti ET (colonne 4-6) sono state lisate (colonne 1-4) o sottoposte ad una blanda sonicazione per ottenere la frazione citosolica (colonne 2-5) e le frazioni membranose (colonne 3-6) secondo la metodica del frazionamento. (A) Le diverse frazioni sono state analizzate mediante Western blot con anticorpo anti-SHP-2, di cui i valori della significatività densitometrica sono riportati sotto le relative bande, o con anti-SHP-1 o con anti-Src. B) Le varie frazioni sono state immunoprecipitate sia con anti-Src che con anti-SHP-2 e gli immunocomplessi sono stati sottoposti a rivelazione anticorpale dopo Western blot con anti-SHP-2 o anti-Src o anti-JAK2. Il pannello è rappresentativo dei dati ottenuti da 12 donatori e 12 ET (eterozigoti o omozigoti per JAK2<sup>V617F</sup>), eccetto per l'esperimento con l'anticorpo anti-JAK2, eseguito solo in 4 donatori e 4 ET. C) Piastrine di donatori, di PV e di ET sono state incubate in assenza (colonne 1-2), o in presenza di pervanadato 0,5mM (colonna 3), o in presenza di calpeptina (colonna 4) per 5 minuti. Le cellule sono state poi lisate ed è stata valutata l'attività tirosin fosfataseica basale su [33P]phospho-band 3 eritrocitaria, descritta dettagliatamente nei metodi. I campioni sono poi stati sottoposti a SDS/PAGE ed è stata valutato il legame del 33P-phosphate alla band 3, mediante autoradiografia seguita dalla conta della radioattività mediante scintillatore. L'attività fosfataseica è espressa dal 33P rilasciato dal 33P-phospho band 3. I risultati in figura sono rappresentativi di esperimenti eseguiti in triplo su 6 donatori, 5 PV e 7 ET. \*\*P<0,001 vs attività fosfataseica di piastrine di donatori.

Per valutare se il reclutamento di SHP-2 alle membrane cellulari sia concomitante con l'attivazione delle fosfatasi, è stata analizzata l'attività costitutiva di SHP-2, sia nelle piastrine di soggetti sani che in quelle di PV ed ET. Le cellule sono state lisate in condizioni tali da preservare la conformazione nativa della SHP-2, e l'attività fosfataseica è stata testata utilizzando [33P]phospho-Tyr-band-3

eritrocitaria, substrato di SHP-2. I lisati ottenuti da pazienti PV ed ET mostrano circa una doppia attività fosfatasica basale rispetto ai lisati di controllo (figura 23 C, colonna 2). Mentre l'aggiunta di pervanadato, inibitore delle tirosin fosfatasi ad ampio spettro, riduce notevolmente la defosforilazione della P-Tyr-band-3 in tutti i saggi, la calpeptina, inibitore selettivo della SHP-2, influenza solo l'attività fosfatasica degli esperimenti condotti su pazienti (figura 23 C, colonne 3,4), stando ad indicare la presenza di una SHP-2 costitutivamente attiva nelle piastrine di soggetti Ph-MPDs.

**Effetto di TPO sull'attivazione di JAK2 e Src nelle piastrine di sani e di soggetti ET.** Come sottolineato nel capitolo “La stimolazione con  $\alpha$ -trombina porta all'attivazione di Src e JAK2 nelle piastrine di pazienti con Ph-MPDs”, la TPO non è stata presa in considerazione tra gli agonisti da utilizzare per gli esperimenti condotti; nonostante ciò, è stato interessante analizzare il suo effetto sull'attivazione di Src e JAK2 nelle piastrine di pazienti ET JAK2<sup>V617F</sup>-negativi e positivi.

In accordo con i risultati precedenti, è stato trovato che 200 ng/mL di TPO sono molto meno efficaci rispetto a 20 mU/mL di trombina nell'indurre la protein tirosin fosforilazione sia nei normali che negli ET (figura 24 A, in alto). L'attivazione di Src determinata da TPO è meno del 30% rispetto a quella determinata dalla trombina nei campioni sani e negli ET e, compatibilmente con la conformazione “preattivata” della chinasi, l'autofosforilazione di Src si verifica prima delle piastrine del malato rispetto a quelle di donatore sano (figura 24 A, parte centrale). Al contrario, in tutti i campioni, TPO promuove un'attivazione di JAK2 precoce e sorprendentemente più efficace rispetto alla trombina (figura 24 A, in basso). Di conseguenza la fosforilazione di STAT5 determinata da TPO è per lo più abolita trattando le cellule con *JAK2-inhibitor-I* (figura 24 B colonne 2,4,8,10), ma non è significativamente influenzata dall'inibizione di Src sia nelle piastrine normali che nelle patologiche (figura 24 B colonne 2,6,8,12).



**FIGURA 24: Effetto di TPO sull'attivazione di Src e JAK2 in piastrine di donatori e di piastrine con ET.**

A) Le piastrine di donatori (colonne 1-5) o di pazienti con ET (colonne 6-10) sono state trattate con Tpo 200 ng/ml (colonne 2-4-7-9) o 20 mU/ml di trombina (colonne 5-10) per i tempi indicati. Le cellule sono state lisate e aliquote dei lisati sono stati analizzati mediante Western blot con anticorpo anti-pTyr (parte alta del pannello). Le piastrine sono state lisate. Aliquote dei lisati sono state immunoprecipitate con anti-Src e gli immunoprecipitati sono stati sottoposti a rivelazione anticorpale con anti-Src-pTyr4116 e con anti-Src (parte centrale del pannello). Aliquote dei lisati sono state lisate e immunoprecipitate con anti-JAK e gli immunoprecipitati sono stati sottoposti ad rivelazione anticorpale con anti-p-JAK2 e anti-JAK2 (parte bassa del pannello). I valori della significatività densitometrica relativi alle chinasi fosforilate sono riportati sotto le relative bande.

B) Le piastrine di donatori (colonne 1-6) e di pazienti ET (colonne 7-12) sono state trattate senza (colonne dispari) o con (colonne pari) 200 ng/ml di TPO per 2 minuti in assenza (colonne 1-2-7-8), o presenza di JAK-inhibitor-I 1  $\mu$ M (colonne 3-4-9-10), o di PP2 10  $\mu$ M (colonne 5-6-11-12). I lisati piastrinici sono stati analizzati mediante Western blot con anti-p-STAT5 e anti-STAT5. I valori della significatività densitometrica relativi ad anti-p-STAT5 sono riportati sotto le relative bande e risultano dai dati ottenuti da 6 donatori, 3 ET JAK2<sup>V617F</sup> negativi e 3 ET JAK2<sup>V617F</sup> positivi. \*\*P<0,001 vs fosforilazione di STAT5 in assenza di inibitori.



## ***5 Discussione***

Nel corso dello studio è stata analizzata l'attività delle tirosin chinasi Src e JAK2 a livello delle piastrine non stimolate e stimolate con trombina di donatori sani e di pazienti con policitemia vera (PV) e trombocitemia essenziale (ET).

I risultati ottenuti dimostrano che, nelle piastrine non stimolate di soggetti con Ph-MPDs, la chinasi Src è presente nella sua conformazione defosforilata e potenzialmente attiva, probabilmente come conseguenza della sua interazione con la tirosin fosfatasi SHP-2. La cascata di signaling dipendente dall'attivazione di Src indotta da una concentrazione bassa di trombina inizia prima di quella conseguente all'attivazione di JAK2 e si verifica prima nelle piastrine patologiche rispetto ai controlli.

Numerosi risultati sostengono il fatto che vi sia la presenza di una chinasi Src potenzialmente attiva nelle piastrine non stimolate di pazienti con Ph-MPDs. Infatti, nelle piastrine non stimolate di donatori sani la fosforilazione di Src a livello della Tyr527 mantiene la chinasi in una conformazione inattiva mentre, nelle piastrine non stimolate di PV ed ET, questo residuo è defosforilato. Inoltre la tirosin fosfatasi SHP-2 presenta caratteristiche anomale nelle piastrine di pazienti con Ph-MPDs; nonostante nei soggetti malati SHP-2 sia localizzata esclusivamente nel citosol, un'aliquota della fosfatasi è presente nelle membrane delle piastrine di Ph-MPD, dove interagisce con la chinasi Src. Poiché l'attivazione di SHP-2 è concomitante con il reclutamento della fosfatasi da parte del suo substrato, i nostri dati suggeriscono che questa fosfatasi potrebbe essere responsabile della defosforilazione della Tyr527 di Src nelle piastrine di individui con Ph-MPDs; l'ipotesi è sostenuta dal livello di attività fosfataseica di SHP-2 misurata nelle piastrine dei malati.

In accordo con il suo stato conformazionale, gli immunoprecipitati di Src ottenuti da piastrine non stimolate di soggetti sani hanno un'attività chinasica in vitro praticamente assente, mentre gli immunocomplessi di Src di PV ed ET mostrano un'attività basale sostanziale. Tuttavia, nonostante la conformazione potenzialmente attiva della chinasi Src, le piastrine non stimolate patologiche possiedono una scarsa tirosin fosforilazione basale, comparabile con quella delle piastrine normali. Questi risultati suggeriscono che nelle piastrine di soggetti Ph-

MPDs la tirosin fosforilazione mediata da Src è ancora sotto il controllo di modulatori esterni, che sono richiesti per indurre un signaling Src-mediato.

A seguito di stimolazione piastrinica con alta concentrazione di trombina, l'attività della chinasi Src nelle cellule sane e patologiche raggiunge livelli simili. Quindi, nonostante Src sia già in qualche modo predisposta per l'attivazione nelle piastrine di Ph-MPDs, la cascata di signaling indotta da Src è innescata solo dopo stimolazione. Una debole stimolazione con basse concentrazioni di trombina porta ad un'attivazione più rapida del signaling indotto da Src nelle piastrine patologiche rispetto a quelle normali. Questo viene dimostrato dai tempi di risposta con i quali Src è autofosforilata in Tyr416 e si verifica la tirosin fosforilazione dei substrati Src, STAT5 e cortactina. Da notare il fatto che la fosforilazione di cortactina mediata da Src è stata vista essere coinvolta nei processi piastrinici indotti da trombina di riarrangiamento citoscheletrico di aggregazione.

L'analisi della mobilitazione del calcio intracellulare e dell'aggregazione, eventi rispettivamente a monte e a valle della cascata di attivazione piastrinica, promossi da concentrazioni basse di trombina, dimostra che questi due processi sono più evidenti nei pazienti con Ph-MPDs rispetto alle piastrine dei controlli, a supporto dell'ipotesi di una maggior sensibilità dei pazienti. Il fatto che l'inibitore di Src PP2 inibisca l'aggregazione delle piastrine dei pazienti in maniera più efficace rispetto a quanto succede nei sani porta a concludere che la preattivazione di Src è implicata in una anomala funzionalità piastrinica.

Sebbene siano necessari ancora numerosi studi, si può ipotizzare che la preattivazione di Src e la relativa iperattività piastrinica a deboli stimoli possono concorrere a determinare l'inizio di uno stato di ipercoagulazione, potenzialmente presente in tutti i pazienti PV ed ET anche senza manifestazioni cliniche, e della patogenesi di Ph-MPDs. Questi risultati mostrano anche che il signaling a seguito della tirosin fosforilazione indotto da trombina nelle piastrine di PV e di ET è diverso rispetto a ciò che si verifica nei sani. In particolare, mentre nelle piastrine dei controlli la fosforilazione di STAT5 dipende per lo più dall'attività di JAK2, nelle piastrine patologiche questa protein tirosin fosforilazione è largamente imputabile all'attività di Src. Inoltre, basse concentrazioni di trombina portano

nelle piastrine di malati una precoce fosforilazione di STAT5 dipendente da Src, che si verifica prima dell'attivazione di JAK2. Tutto questo è in accordo con la via di attivazione alternativa di STAT5 descritta, la quale dipende dai membri della famiglia Src e determina una trasformazione cellulare e l'insorgere di tumori. L'analisi degli elementi della famiglia ERK1/2 e di una via alternativa di signaling a valle di JAK2<sup>V617F</sup>, mette in evidenza che la loro attivazione è mediata dall'attività di Src in maniera analoga. E' stata anche confrontata per la prima volta l'attività mostrata dagli immunoprecipitati JAK2 di piastrine normali o omozigoti JAK2<sup>V617F</sup>, con il risultato che i wild-type nativi e i mutati hanno una simile attività chinasi in vitro, che non sembra essere influenzata dalla mutazione V617F. L'analisi della cascata di signaling indotta da JAK2 mostra che JAK2 e i suoi effettori STAT5 ed ERK1/2 non vengono fosforilati nelle piastrine non stimolate di soggetti sani o con Ph-MPD (JAK2<sup>V617F</sup> negativi o positivi) e che il tempo di risposta di attivazione di JAK2 a seguito di stimolo sia con trombina che con TPO sono simili nei controlli e nelle cellule patologiche. Questi risultati dimostrano che JAK2<sup>V617F</sup> non è costitutivamente attiva nelle piastrine di Ph-MPD, in accordo con quei dati che suggeriscono come la mutazione V617F non sia sufficiente a causare l'attivazione costitutiva di JAK2. Infatti la fosforilazione di JAK2 era stata vista essere assente nelle piastrine non stimolate ottenute da PV ed ET wild-type e mutati. In conclusione, i risultati dimostrano che un'attivazione anomala e il reclutamento della tirosin fosfatasi SHP-2 da parte della chinasi Src sono collegate alla preattivazione della chinasi, la quale è implicata nella ipersensibilità delle piastrine di soggetti con Ph-MPD e probabilmente coinvolta nelle anomalie funzionali delle piastrine di pazienti PV ed ET.

Questo lavoro ha determinato un cambio di prospettiva per le indagini su questi disordini mieloproliferativi, spaziando dalle chinasi alle fosfatasi e proponendo SHP-2 come il vero oggetto di indagine per comprendere le alterazioni nelle vie di trasduzione piastriniche in questo tipo di patologie.



# *Seconda parte*



## ***1 Piastrine e immunità innata***

Le piastrine sono note principalmente per il loro ruolo di mediatori nell'emostasi, funzione strettamente associata anche con processi di tipo infiammatorio; tuttavia è sempre più chiaro come queste cellule rivestano un ruolo attivo sia nell'immunità innata che in quella acquisita. Infatti le interazioni delle piastrine con leucociti e cellule endoteliali mediante la P-selectina può portare a diversi eventi pro-infiammatori, quali l'attivazione leucocitaria, la produzione di citochine e il reclutamento di leucociti a livello della sede del danno. Oltre a questo, le piastrine esprimono molecole legate all'attività immunologica come CD40L e recettori Toll-like, che sono in grado di modulare l'immunità innata. Le piastrine stesse, inoltre, possono interagire con microorganismi e diversi tipi di virus sono stati visti cross-reagire immunologicamente con gli antigeni piastrinici. Pertanto le piastrine rivestono un ruolo centrale nell'infiammazione di conseguenza sono coinvolte in diverse condizioni patologiche, come aterosclerosi, sepsi e trombocitopenia purpurea, suggerendo che le piastrine agiscono come mediatori primari nell'immunità innata (Semple J.W. and Freedman J., 2010).

### **1.1 I recettori Fc $\gamma$**

Molte cellule del sistema immunitario esprimono recettori per la regione Fc delle immunoglobuline G (IgG), denominati Fc $\gamma$ R; questa famiglia eterogenea di molecole riveste un ruolo critico nella immunità (Ravetch J. and Bolland S., 2001).

La regione Fc delle IgG è separata dalla parte che lega l'antigene da una "regione cerniera" flessibile, localizzata tra il primo e il secondo dominio costante della catena pesante: in questo modo si evidenziano due domini strutturali, il dominio C<sub>H</sub>2 e il dominio C<sub>H</sub>3. Studi cellulari e strutturali hanno dimostrato che la porzione a valle della "regione cerniera" contiene il principale sito di legame per Fc $\gamma$ R. Il cross-linking delle molecole Fc $\gamma$ R di membrana è un requisito per l'attivazione cellulare mediata da IgG. Poiché la porzione Fc è costituita da due catene polipeptidiche identiche, ogni IgG può potenzialmente legare due Fc $\gamma$ R e dare luogo alla risposta cellulare anche in assenza di antigeni multivalenti; in

generare l'interazione stechiometrica che si verifica tra Fc $\gamma$ Rs a bassa affinità e le IgG è di 1:1 (Kato K. et al., 2000).

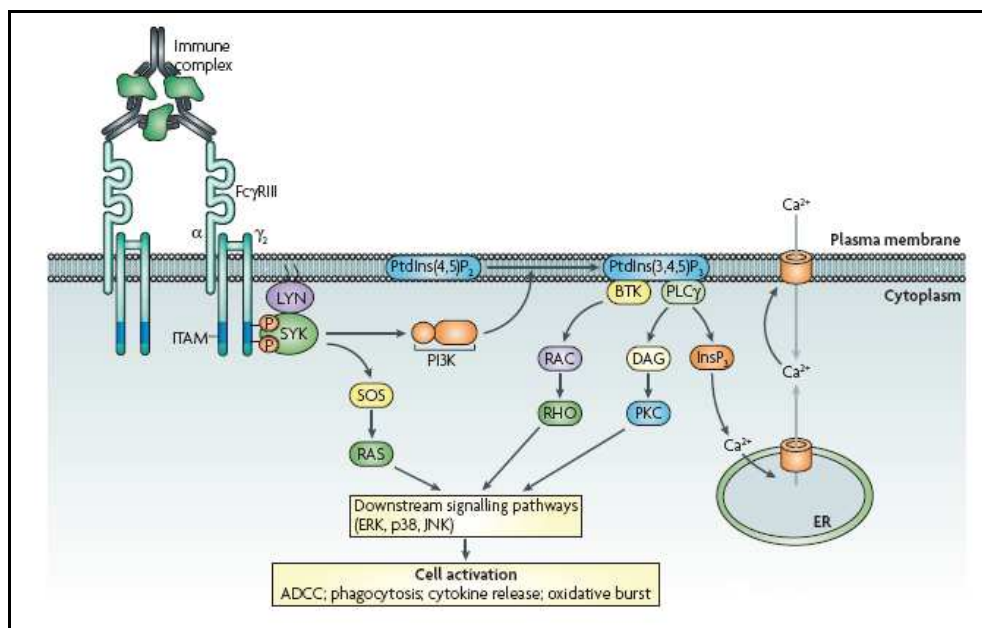
La regione citoplasmatica di questi recettori permette agli Fc $\gamma$ Rs di coordinare diversi tipi di risposta all'interno del sistema immunitario. Esistono infatti due tipi di Fc $\gamma$ Rs: quelli attivatori e quelli inibitori.

Fc $\gamma$ Rs di tipo attivatorio contengono un motivo ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) nella loro porzione citoplasmatica e permettono alle cellule immunitarie effettrici di esplicare l'attività infiammatoria, citologica e fagocitaria. Gli ITAM contengono tipicamente due tirosine nella seguente configurazione: YXXL X(6-12) YXXL, dove X può essere un qualsiasi amminoacido; queste tirosine sono fosforilate in seguito al cross-linking del recettore (Daniels A.B. et al., 2010). La presenza di questi importanti motivi citoplasmatici fosforilabili permette a tali recettori di comportarsi anche da co-recettori, associandosi ad altri recettori privi di ITAM; questo è il caso, ad esempio, dei recettori GPVI (Tsuji M. et al., 1997) GPIb-IX-V (Sullam P.M. et al., 1998), che formano un complesso non-covalente con Fc $\gamma$ Rs.

Una volta fosforilato, generalmente da parte delle SFKs, il recettore funge da docking-site per le proteine del signaling contenenti domini SH2, compresa la tirosin chinasi Syk, che attiva numerose altre molecole come la PI3K e SOS (Son of Seveless). La generazione di fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) recluta la tirosin chinasi di Bruton (BTK) e la PLC $\gamma$ , che portano all'attivazione di altre chinasi a valle e il rilascio del calcio dal reticolo endoplasmatico (Figura 25).

I Fc $\gamma$ Rs inibitori, invece, contengono un ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) a livello citoplasmatico e regolano negativamente la risposta cellulare in seguito al cross-linking con i recettori contenenti ITAM (Hulett M.D. and Hogarth P.M., 1994).





**Figura 25: Signaling indotto da FcγRs** (*Nat Rev Immunol.* 2008 Jan;8(1):34-47.)

In figura 26, invece, viene illustrata un altro tipo di classificazione dei FcγRs, che vengono suddivisi in FcγRI, con elevata affinità per le IgG monometriche, e FcγRII e FcγRIII, con bassa affinità per le IgG monometriche.

	Activating Fc receptors					Inhibitory Fc receptor
<i>Mouse</i>						
Structure						
Name	FcγRI	FcγRIII	FcγRIV	FcγRIIB		
Affinity	High	Low to medium	Low to medium	Low to medium		
<i>Human</i>						
Structure						
Name	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB	FcγRIIB
Affinity	High	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium
Alleles		FcγRIIA <sup>131H</sup> FcγRIIA <sup>131R</sup>		FcγRIIIA <sup>138V</sup> FcγRIIIA <sup>138F</sup>	NA1 NA2	FcγRIIB <sup>232S</sup> FcγRIIB <sup>232T</sup>

**Figura 26: La famiglia dei recettori Fc per le IgG.** La figura riporta la classificazione dei recettori Fcγ in base alla loro presenza nell'uomo e/o nel topo, alla affinità nei confronti delle IgG e, per l'uomo, all'eventuale presenza di varianti alleliche. (*Nat Rev Immunol.* 2008 Jan;8(1):34-47)

## 1.2 FcγRIIA (CD32) nelle piastrine

FcγRIIA è un recettore a bassa affinità per le IgG appartenente alla famiglia dei FcγRs; esso è l'unico tra i FcγRs ad essere stato individuato sulle piastrine umane (Gratacap M.P. et al., 2000). Presente nell'uomo ma non nel topo, FcγRIIA è inoltre espresso nei macrofagi e nei monociti, nei neutrofili e nelle cellule dendritiche; quantitativamente però, la maggiore parte dei FcγRIIA si trova a livello delle piastrine, dove è stato dimostrato regolare il rilascio di serotonina, è coinvolto nell'attivazione e aggregazione piastrinica e media l'endocitosi dei complessi con le IgG (Worth R.G. et al., 2006; Gratacap M.P. et al., 2000).

FcγRIIA nelle piastrine può svolgere le sue funzioni autonomamente o può essere co-associato con GPIIb-IX-V ed essere attivato dal vWF o in seguito alla stimolazione di recettori accoppiati alle proteine G. (Sullam P.M. et al., 1998). Inoltre FcγRIIA riveste un importante ruolo nella mediazione dell'attivazione in risposta a immunocomplessi ed è implicato in quelle disfunzioni delle piastrine riscontrate nei pazienti con trombocitopenia indotta da eparina (HIT) (Reilly M.P. et al., 2001).

Strutturalmente FcγRIIA è una glicoproteina transmembrana di 40 kDa, contenente due motivi Ig-like nella porzione extracellulare e un motivo ITAM nella regione citoplasmatica. Nella regione citoplasmatica sono in realtà presenti tre residui tirosinici, uno in posizione 275, a monte dell'ITAM, e due nell'ITAM, nelle posizioni 282 e 298. La sequenza dell'ITAM dell'FcγRIIA è atipica in quanto sono presenti 12 aminoacidi all'interno della sequenza, invece dei 6-8 aminoacidi che si trovano solitamente in questi motivi.

I due residui tirosinici citoplasmatici conservati dell'ITAM sono indispensabili per l'attivazione dell'FcγRIIA. Come in tutti gli FcγRs, anche nell'FcγRIIA le tirosine vanno incontro a fosforilazione, evento promosso di norma dall'associazione con una SFKs (Huang M.M et al., 1992). La fosforilazione permette la creazione di un docking-site per le proteine contenenti domini SH2, in particolare Syk; successivamente si verifica l'assemblaggio di un complesso multiproteico coinvolto nel signaling, contenente la molecola adattatrice citosolica SLP-76 e uno o più membri della famiglia delle tirosin chinasi Bruton (Btk), che porta all'attivazione della PLCγ2 e/o PLCγ1, che supportano un'altra estesa serie

di risposte cellulari (Boylan B. et al., 2008). La presenza di SFKs permette anche la fosforilazione del substrato cortactina, proteina coinvolta nel rimodellamento di actina (Arderiu G. et al., 2002). Un'altra delle altre molecole interessate nell'ambito del signaling piastrinico indotto dal cross-linking di Fc $\gamma$ RIIA è LAT (Linker for Activation of T cells), un adattatore transmembrana la cui forma fosforilata è stata vista interagire con PI3K e PLC $\gamma$ 2 (Asazuma N. et al., 2000). Il signaling più a valle di questo recettore vede invece l'attivazione delle vie del segnale mediate da molecole quali ERK e p38, con aggregazione piastrinica (Nimmerjahn f and Ravetch J., 2008).

Fin'ora è stato caratterizzato un solo polimorfismo del recettore Fc $\gamma$ RIIA, all'interno del secondo dominio Ig-like, una sostituzione aminoacidica in posizione 131 da un'Istidina (H) a un'Arginina (R). Le frequenze alleliche di H e R sono circa uguali; R131 e H131 sono codominanti nella popolazione europea e le frequenze dei due genotipi omozigoti sono del 25% e dell'eterozigote H/R del 50% (Salmon J.E. and Pricop L., 2001).

Il genotipo H/H viene generalmente considerato come "high-binding" per le IgG<sub>2</sub>; mentre R/R è "low-binding".

## ***2 La trombocitopenia indotta da eparina (HIT)***

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una reazione immunologica avversa dovuta alla terapia eparinica e fu descritta per la prima volta più di 50 anni fa (Wiesmann R.E., 1958). Sebbene la HIT sia considerata una patologia rara, molti sono i pazienti sottoposti all'eparina, così che il numero di soggetti affetti da questa complicanza è con tutta probabilità il più alto tra tutti gli effetti collaterali indotti dal farmaco (oltre alla trombocitopenia indotta dalla chemioterapia) ed è assolutamente il più frequente tra i disordini ematologici immuno-mediati indotti da farmaco.

Per prevenire le complicanze tipiche della HIT, sono importanti una diagnosi tempestiva e l'utilizzo di anticoagulanti non eparinici alternativi; tuttavia l'identificazione di questa patologia può essere problematica, a causa del fatto che i due sintomi che la caratterizzano, trombocitopenia e trombosi, non sono specifici per la HIT. La diagnosi clinica basata sulla conta piastrinica risulta inoltre

particolarmente difficile nei pazienti con un'alta incidenza di trombocitopenia, ad esempio nei malati gravi: più del 50% dei soggetti in terapia intensiva sviluppano trombocitopenia dovuta a cause diverse dalla HIT. Anche la trombosi può indurre diagnosi errate in quanto la reazione avversa al farmaco nella HIT causa esattamente la complicanza che l'eparina dovrebbe prevenire; vi è quindi il rischio che i nuovi casi di trombosi possano essere considerati come un insuccesso della terapia piuttosto che un disordine immuno-mediato.

Il test per l'identificazione degli anticorpi contro il complesso PF4/eparina può aiutare a identificare i pazienti la cui trombocitopenia è dovuta alla HIT; la presenza di questi anticorpi è comunque molto più frequente rispetto alle manifestazioni cliniche della malattia (Greinacher A. et al., 2010).

Sono stati descritti due tipi di trombocitopenia indotta da eparina. La HIT di tipo I è caratterizzata da una lieve, transitoria e asintomatica riduzione della conta piastrinica (che raramente scende al di sotto di  $100 \times 10^9$  piastrine/L) che si verifica durante i primi giorni di terapia e che si risolve spontaneamente e senza la sospensione del trattamento con eparina. L'origine di questa forma di trombocitopenia non è chiara ma si ritiene possa essere collegata al fenomeno di "clumping" indotto dall'eparina; in questo contesto non interviene il sistema immunitario e le manifestazioni patologiche sono rare (Fabris F. et al., 2000).

La HIT di tipo II ha un'origine immunologica ed è caratterizzata da una significativa trombocitopenia (con riduzione del numero di piastrine > 30%) che si verifica generalmente dopo il 5° giorno di terapia; se il trattamento con eparina è interrotto, il recupero nella conta piastrinica avviene nei 5-15 giorni successivi alla sospensione del farmaco, ma sono stati descritti alcuni casi nel quale sono stati necessari dei mesi per ritornare a valori di piastrine normali. La HIT di tipo II sembra inoltre comparire prima in quei pazienti che già sono stati trattati con eparina (Warkentin T.E. et al., 2003).

Nonostante la trombocitopenia, le manifestazioni emorragiche non sono frequenti, mentre la maggiore complicanza clinica è la trombosi. La HIT si associa a trombosi arteriose e venose (HITT) nel 50% dei casi ed in circa la metà di questi pazienti essa viene diagnosticata proprio per la presenza di un nuovo evento trombotico (Warkentin T.E. et al., 1996). Il 40-50% dei rimanenti pazienti con

trombocitopenia isolata sviluppa trombosi se trattato in solo modo conservativo sospendendo l'eparina, non è infatti sufficiente sospendere immediatamente il trattamento eparinico, ma deve essere utilizzato un altro anticoagulante non in grado di interagire con gli anticorpi (Wallis D.E., 1999). Le trombosi arteriose sono più frequenti in pazienti cardiovascolari, mentre quelle venose nei pazienti sottoposti a profilassi post-chirurgica.

## 2.1 Patogenesi

Le basi immunologiche della trombocitopenia indotta da eparina sono ormai comunemente accettate; esse furono avanzate per la prima volta da Rhodes, che mostrò come le IgG presenti nel siero dei pazienti con HIT determinassero l'aggregazione piastrinica *in vitro* se in presenza di eparina in concentrazioni terapeutiche (Rhodes G.R. et al., 1973). Fu anche dimostrato che i complessi immunoglobuline-eparina si formavano solo in presenza di piastrine (Green D. et al., 1978).

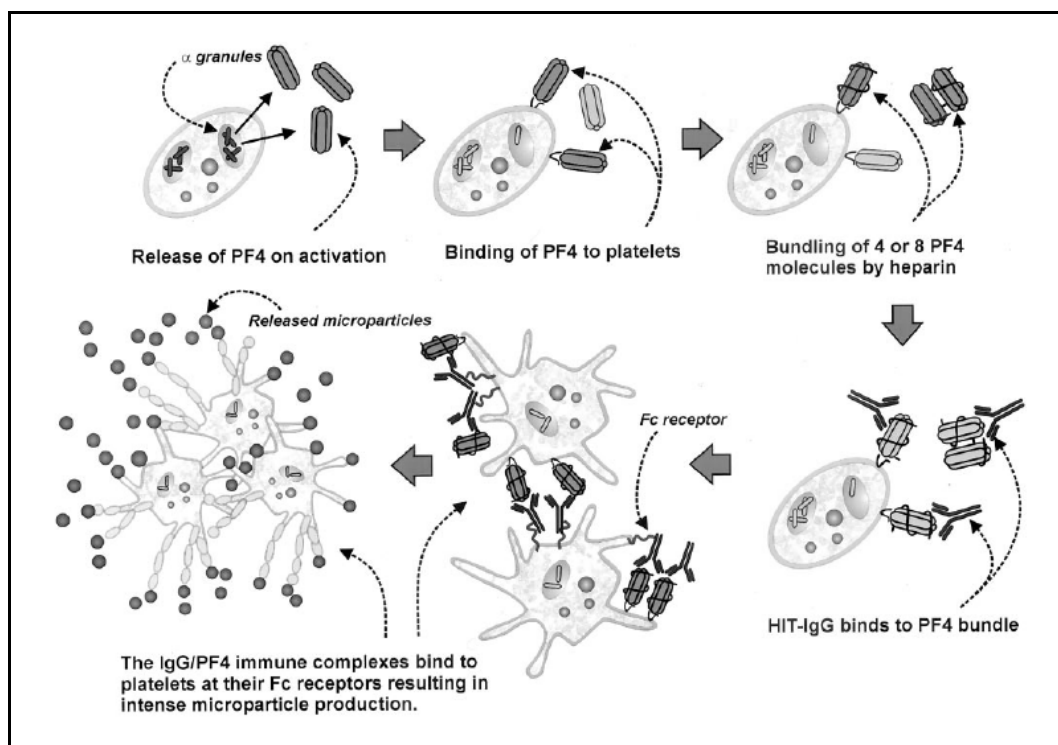
L'effetto pro-aggregante dell'eparina dipende dal grado di solfatazione e dal peso molecolare ed è mediato dal rilascio degli  $\alpha$ -granuli dalle piastrine. Molte delle proteine piastriniche sono state descritte come possibili recettori di anticorpi eparina-dipendenti e il PF4 come principale cofattore. L'anticorpo non è specifico esclusivamente per il complesso eparina/PF4 ma lega anche complessi formati da PF4 e altri glicosaminoglicani (GAGs), sulla base del grado di solfatazione e della lunghezza del polisaccaride.

Il rapporto PF4/eparina sembra essere critico per la formazione di complessi antigenici multimolecolari: i valori ideali vedono PF4:eparina nel rapporto 4-6:1. A concentrazioni terapeutiche, valori di eparina compresi tra 0,1 e 1,0 U/ml spiazzano il PF4 dall'eparan-solfato endoteliale o che viene rilasciato direttamente dalle piastrine; il PF4 si lega alle molecole di eparina e si forma il complesso solubile immunogenico; gli anticorpi anti eparina/PF4 attivano le piastrine, determinando una lesione endoteliale immunomediata, con trombocitopenia e/o trombosi (Fabris F. et al., 2000).

Nello specifico, gli immunocomplessi *cross-linkano* il recettore Fc $\gamma$ RIIa sulle piastrine determinando:

- generazione di microparticelle piastriniche;
- attivazione di monociti e cellule endoteliali;
- attivazione della cascata coagulativa, che porta ad una generazione massiva di trombina.

Gli immunocomplessi attivano le piastrine principalmente attraverso il legame con il recettore Fc $\gamma$ RIIA (Figura 27). Infatti l'attivazione piastrinica è bloccata sia dall'anticorpo monoclonale specifico per l'Fc $\gamma$ RIIA (IV.3) che dai frammenti F(ab')<sub>2</sub> dei pazienti con HIT di tipo II. Il polimorfismo arginina/istidina in posizione 131 del recettore Fc $\gamma$ RIIA influenza la reattività delle piastrine agli immunocomplessi; in particolare, il fenotipo His/His è più responsivo nei confronti delle IgG<sub>2</sub>. Nonostante ciò, mentre alcuni studi hanno messo in evidenza una maggior prevalenza di HIT di tipo II e di complicazioni trombotiche in soggetti con il fenotipo His/His, altri lavori non hanno confermato questi dati.



**Figura 27: Rappresentazione schematica dell'attivazione piastrinica in pazienti con HIT** (*Chest. 2005 Feb;127(2 Suppl):9S-20S.*)

Non è ancora chiaro comunque come gli anticorpi anti eparina/PF4 causino trombosi. In generale gli anticorpi anti eparina di tipo IgG<sub>2</sub> non sono così tanto

più frequenti nei pazienti con HIT di tipo II rispetto ad altre sottoclassi, e anche le IgM e le IgA, che non sono in grado di legare FcγRIIA, sono presenti in percentuale significativa in questi pazienti. Questi dati suggeriscono che il meccanismo di attivazione piastrinica potrebbe verificarsi in maniera indipendente dal recettore FcγRIIA per le IgG. Inoltre l'isotipo dell'anticorpo tende a modificarsi in relazione alla durata del trattamento. Gli anticorpi sono rilevabili nel siero dei pazienti per circa 4-6 settimane, nonostante siano stati descritti dei casi nei quali il tempo di persistenza di questi è stato più lungo.

Altri dubbi riguardanti la patogenesi descritta sono emersi da un modello sperimentale nel topo, nel quale lo sviluppo di anticorpi contro il complesso eparina/PF4 porta ad un quadro trombocitopenico ma non a trombosi. Da un punto di vista patogenetico, è probabile che uno stato di preattivazione delle piastrine e dell'endotelio e altri aspetti al momento ancora ignoti relativi ai pazienti, possano contribuire a determinare i fenomeni trombotici (Fabris F. et al., 2000).

## **2.2 Sintomi e manifestazioni cliniche**

L'inizio della trombocitopenia è indipendente dal tipo di eparina, dal suo dosaggio e dal modo di somministrazione. L'entità della trombocitopenia solitamente varia tra valori di 50 e  $100 \times 10^9$  piastrine/L ma sono frequenti anche casi più gravi. Non esiste una predominanza tra i due sessi; sembrano invece essere più a rischio i pazienti anziani sottoposti a profilassi post-chirurgica o a trattamenti per trombosi venose importanti, interventi di chirurgia ortopedica o cardiovascolare. In più del 60% dei casi si verificano altri fattori pro-trombotici concomitanti come diabete, tumori, insufficienza cardiaca, lupus eritematoso sistemico, sindrome antifosfolipidica, infezioni o traumi. Accanto alla trombocitopenia, possono essere presenti anche manifestazioni allergiche cutanee e necrosi della cute. Non sono invece frequenti eventi emorragici mentre le maggiori complicanze cliniche nel 30% dei pazienti sono trombosi sia arteriose che venose, causa del 20% della mortalità. L'evento trombotico risulta spesso il peggioramento delle trombosi per il quale l'eparina era stata precedentemente somministrata, o può essere una nuova complicanza tromboembolica; le complicanze trombotiche possono

verificarsi anche in assenza di trombocitopenia. Le trombosi arteriali furono il primo evento ad essere associato alla HIT; nonostante ciò, attualmente la prevalenza di complicazioni trombotiche arteriali e venose è praticamente la stessa. Le trombosi arteriose sembrano essere più frequenti nei pazienti con malattie cardiovascolari, mentre quelle venose sono spesso più riscontrabili nei soggetti sottoposti a profilassi post-chirurgica. Le complicanze arteriali più comuni sono le trombosi dei grandi vasi, con cancrena e amputazioni di arti, ictus, infarti del miocardio e trombosi cardiache. Le complicanze venose sono trombosi vascolari profonde, embolismo polmonare, trombosi dei seni cerebrali e chiusura della fistola artero-venosa nei pazienti dializzati; solo occasionalmente sono state descritti processi coagulativi intravascolari disseminati e necrosi emorragica surrenale (Fabris F. et al., 2000).

### **2.3 Polimorfismo di Fc $\gamma$ RIIA e HIT**

L'attivazione di Fc $\gamma$ RIIA dovuta ad anticorpi contro il complesso PF4/eparina risulta essere responsabile della patogenesi della trombocitopenia indotta da eparina (HIT); numerosi lavori hanno indagato se il polimorfismo caratterizzato per questo recettore potesse determinare differenze nell'attivazione piastrinica tipica della malattia.

Poiché il genotipo H/H viene generalmente considerato come "High-binding" per le IgG<sub>2</sub>, Karassa e collaboratori hanno avanzato l'idea che questo avrebbe dovuto essere il più rappresentato in pazienti HIT e HITT (Karassa F.B. et al., 2004). Secondo un lavoro di Pouplard del 1999, entrambi i genotipi H/H e R/R danno attivazione piastrinica (test SRA), anche se le piastrine R/R risultano dare un rilascio di serotonina lievemente maggiore; inoltre non sembra esserci prevalenza di H/H nei pazienti HIT, ma di R/R nei pazienti con Trombosi. Infatti, secondo due lavori di Carlsson (Carlsson L.E. et al., 1998; Carlsson L.E. et al., 2003), eseguiti su un campione maggiore di pazienti con HIT e HITT, il genotipo H/H risulta essere maggiore in pazienti HIT, mentre R/R è overespresso nei pazienti HITT, a dimostrazione che le piastrine H/H vengono eliminate più velocemente, mentre le piastrine R/R rimangono in circolo più a lungo, protraendo lo stato protrombotico. Secondo un lavoro di Brandt et al. del 1995, il genotipo H/H



sarebbe meno responsivo agli anticorpi contro il complesso PF4/eparina, mentre il genotipo R/R risponde bene in test in vitro con piastrine di donatori H/H e R/R e anticorpi HIT in presenza di eparina. Vi sono numerose evidenze in letteratura che l'allele R 131 sia un fattore di rischio per la manifestazione di malattie mediate da complessi immuni, come il Lupus Eritematoso Sistemico (Rascu A. et al., 1997). Tale ipotesi è supportata anche dal fatto che i pazienti R/R sono più sensibili alle infezioni batteriche rispetto agli individui H/H: la fagocitosi dei batteri opsonizzati con IgG<sub>2</sub> è meno efficace nei pazienti con il genotipo R/R 131 (Sanders L.A. et al., 1995). Altri lavori non confermano tali ipotesi e dimostrano che non c'è differenza nella distribuzione genotipica o nella frequenza allelica tra pazienti HIT e HITT (Gruel Y. et al., 2004; Arepally G. et al., 1997).

### ***3 Obiettivi***

FcγRIIA è un recettore a bassa affinità per le IgG ed è l'unico della famiglia dei FcγRs ad essere espresso nelle piastrine umane. Esso è in grado di regolare il rilascio di serotonina, è coinvolto nell'attivazione e aggregazione piastrinica e media l'endocitosi dei complessi con le IgG. FcγRIIA riveste un importante ruolo nella mediazione dell'attivazione in risposta a immunocomplessi ed è implicato in quelle disfunzioni delle piastrine riscontrate nei pazienti con trombocitopenia indotta da eparina (HIT). La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una reazione immunologica avversa dovuta alla terapia eparinica; i pazienti infatti sviluppano anticorpi contro il complesso PF4/eparina con conseguente generazione di microparticelle piastriniche, attivazione di monociti e cellule endoteliali e attivazione della cascata coagulativa, con generazione massiva di trombina. Gli immunocomplessi attivano le piastrine principalmente attraverso il legame con il recettore FcγRIIA. Fino ad ora è stato caratterizzato un solo polimorfismo del recettore FcγRIIA, all'interno del secondo dominio Ig-like, una sostituzione aminoacidica in posizione 131 da un'Istidina (H) a un'Arginina (R). Le frequenze alleliche di H e R sono circa uguali: il genotipo H/H viene generalmente considerato come "High-binding" per le IgG<sub>2</sub>, R/R invece come "low-binding". Numerosi studi hanno indagato se il polimorfismo di FcγRIIA

potesse influenzare in qualche modo l'insorgenza della HIT ma i risultati fino ad ora descritti riportano pareri discordanti e lasciano la questione ancora aperta.

Lo scopo di questa seconda parte di tesi è stato quello di valutare l'esistenza di una correlazione tra il polimorfismo di Fc $\gamma$ RIIA e la risposta piastrinica dopo stimolazione del recettore stesso in piastrine di donatori sani, suddivisi in base al polimorfismo del recettore. Sono stati analizzati sia parametri morfo-funzionali, quali cambiamento di forma e aggregazione piastrinica, che meccanismi molecolari della trasduzione del segnale mediato dal recettore, con particolare riguardo a molecole note per essere attivate in queste vie del segnale: SFKs, Syk, LAT, cortactina, ERK.

Poiché il sistema delle PTKs è strettamente correlato con quello delle PTPs, è stato anche indagata l'espressione di fosfatasi, con particolare attenzione alla più abbondante nelle piastrine, la PTP1b.

Il lavoro è stato svolto in collaborazione con il gruppo del Prof. Fabrizio Fabris (Università degli studi di Padova) e del Prof. Mauro Torti (Università degli studi di Pavia).

#### ***4 Risultati***

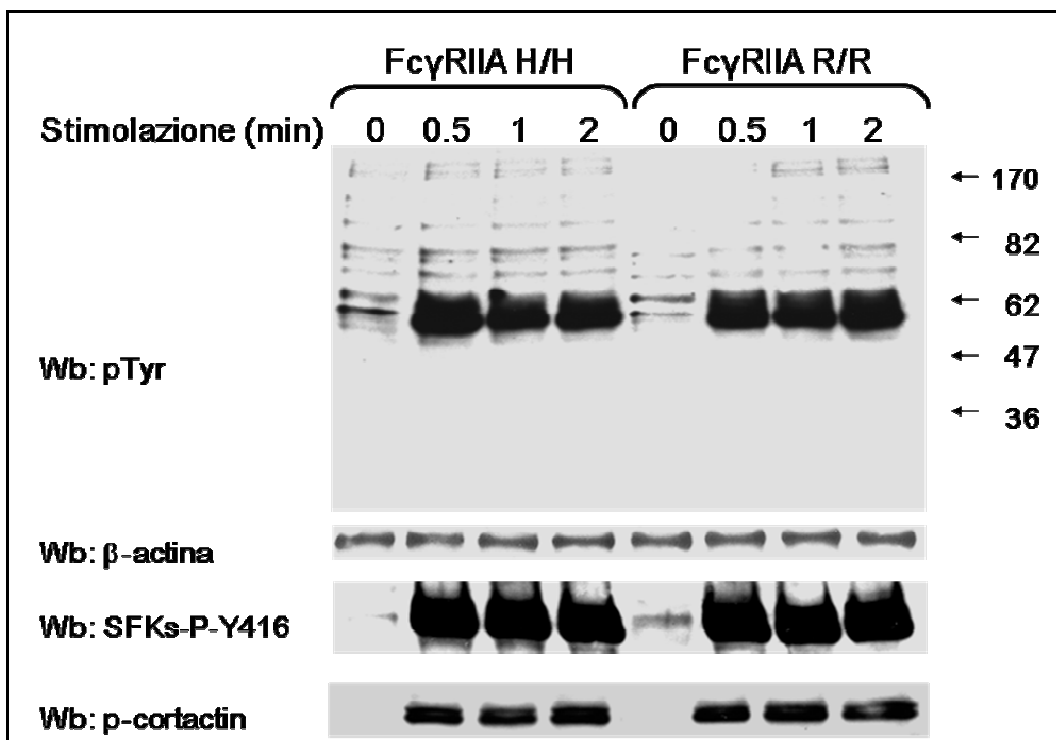
**Stimolazione del recettore Fc $\gamma$ RIIA con anticorpo monoclonale IV.3 di piastrine di donatori Fc $\gamma$ RIIA H/H e Fc $\gamma$ RIIA R/R.** Per valutare se il polimorfismo di Fc $\gamma$ RIIA fosse correlato con l'aumentato rischio di complicazioni trombotiche e potesse da solo giustificare la variabilità dell'incidenza nello sviluppo di HIT, è stata analizzata la capacità delle piastrine di donatori sani che presentavano uno stato omozigote per i due polimorfismi (11 donatori Fc $\gamma$ RIIA H/H e 10 donatori Fc $\gamma$ RIIA R/R) di venire attivate dopo stimolazione del recettore stesso, andando a monitorare in primo luogo lo stato di attivazione delle vie di segnale a valle del recettore. È noto infatti che il legame di immunocomplessi di IgG con Fc $\gamma$ RIIA determina il "clustering" del recettore che viene fosforilato nelle due tirosine della sua sequenza ITAM della regione citosolica da parte delle SFKs generando dei siti di interazione proteina-proteina mediati dall'interazione pTyr-dominio SH2 di proteine segnale. Attraverso questo meccanismo la tirosin chinasi Syk viene reclutata alla membrana plasmatica e attivata, portando alla

fosforilazione di molteplici proteine tra cui LAT, adattatore associato ai rafts di membrana. Questo porta all'attivazione della cascata di signaling che vede coinvolte altre proteine come PLC $\gamma$ 2 e PI3K, fino ad arrivare alla fosforilazione di ERK e al rilascio del calcio, con conseguente aggregazione piastrinica. Poichè con altri agonisti, trombina collagene, trompoeietina, che determinano un cambiamento di forma della piastrina nel corso dell'attivazione, Src fosforila diverse proteine coinvolte nel riarrangiamento citoscheletrico tra cui cortactina, una proteina che partecipa al rimodellamento di actina, è stato valutato lo stato di fosforilazione di queste proteine coinvolte nei processi di attivazione piastrinica. Altra proteina studiata è stata JAK2, tirosin chinasi non recettoriale capace di legarsi a diversi recettori di membrana dopo attivazione e ampiamente descritta nei disordini cronici mieloproliferativi come la trombocitemia essenziale e la policitemia vera, caratterizzati da una JAK2 mutata, e i suoi substrati, componenti della famiglia STAT, in particolare STAT3 e 5.

Il "clustering" di Fc $\gamma$ RIIA è stato indotto in due tempi:

- a) incubazione delle piastrine lavate di donatori Fc $\gamma$ RIIA H/H e Fc $\gamma$ RIIA R/R con anti-human Fc $\gamma$ RII anticorpo IV.3 (Ab IV.3), che si lega al dominio extracellulare del recettore ed è noto essere un inibitore del recettore stesso;
- b) successiva incubazione con F(ab')<sub>2</sub> che promuove il cross-linking dell'anticorpo primario, mimando in tal modo il legame del recettore con immunocomplessi IgG-mediati.

Dopo ogni tipo di stimolazione è stato analizzato, a diversi tempi, lo stato di fosforilazione dei lisati piastrinici e di specifiche proteine mediante analisi Western blot con l'uso di anticorpi specifici. La figura 28 mostra i risultati ottenuti da questo tipo di indagine dopo stimolazione con mAb IV.3.

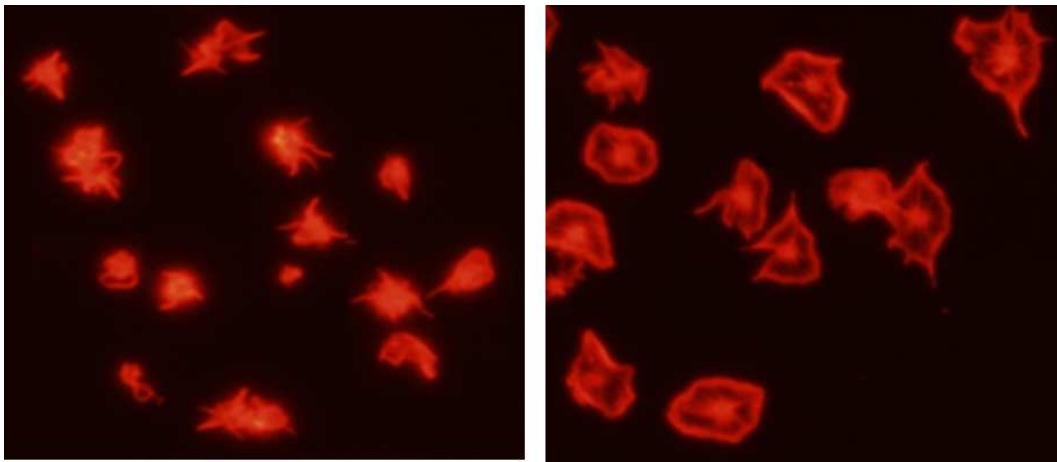


**Figura 28: Stimolazione di piastrine di donatori FcγRIIA H/H e FcγRIIA R/R con mAb IV.3.** Le piastrine sono state ottenute da donatori sani che presentavano uno stato omozigote per i due polimorfismi, secondo il protocollo descritto nei metodi. Le cellule sono state stimulate con mAb IV.3 2 µg/ml per i tempi indicati. Le piastrine sono state successivamente lisate e analizzate mediante Western blot come descritto nei metodi, con anticorpi anti p-Tyr, anti SFKs-P-Y416 e anti-P-cortactina, e infine anti-β-actina per il controllo della quantità proteica. La figura è rappresentativa degli esperimenti condotti su 11 donatori FcγRIIA H/H e 10 donatori FcγRIIA R/R.

Come possiamo osservare il legame di mAb IV.3 al recettore determina un aumento del segnale fosfotirosinico nei lisati dopo soli 30 secondi che riguarda soprattutto una banda di circa 60 kD. che corrisponde alla forma fosforilata in Tyr 416 di Src. L'attivazione di Src determina la fosforilazione di cortactina ma non la fosforilazione di ITAM del recettore e di proteine a valle di questo segnale in particolare LAT, ERK e JAK2 (dati non mostrati). Inoltre non vengono rivelate differenze tra le piastrine dei due gruppi selezionati.

**Spreading piastrinico dopo stimolazione del recettore FcγRIIA con anticorpo monoclonali IV.3 di piastrine.** Per determinare il significato della fosforilazione di Src in posizione 416 e di cortactina in seguito allo stimolo con mAb IV.3, è stato valutato l'effetto di questo stimolo a livello del citoscheletro delle piastrine, esaminando la capacità delle piastrine di effettuare lo spreading su diversi substrati.

A questo scopo è stata utilizzata la falloidina per marcare i filamenti di actina e valutare il tipo di rimodellamento del citoscheletro che l'adesione ad un substrato induce.



A) BSA

B) IV.3

**Figura 29: Spreading piastrinico su BSA e IV.3.**

Dopo il coating over-night con il substrato di interesse. In figura 29A il substrato utilizzato è BSA 0,05% in PBS 1X, in figura 29B il substrato è IV.3 5 µg/ml in PBS 1X. Le piastrine lavate di donatore sano (eterozigote per FcγRIIA) sono state seminate sui vetrini trattati e saturati. Dopo 1 h di incubazione, le cellule sono fissate con paraformaldeide, permeabilizzate e colorate con la falloidina-TRITC (1:500) per almeno 1 h al riparo da fonti luminose. I vetrini sono stati montati con mowiol sul vetrino porta-oggetti e tenuti al buio (over-night) fino alla lettura al microscopio a fluorescenza (ingrandimento 40X) Olympus BX51. I dettagli sperimentali sono descritti nel capitolo dei materiali e metodi.

Come è possibile notare in figura 29, le piastrine adese alla BSA, che rappresentano la condizione basale, presentano dei filamenti di actina piuttosto corti e distribuiti al di sotto della membrana in tutta la cellula; dopo adesione al substrato fibrinogeno, invece, i filamenti si riorganizzano e contribuiscono a formare filopodi, lamellipodi e stress fibers, molto più lunghi ed organizzati. Dopo stimolazione con mAb IV.3, invece, è possibile notare che l'actina modifica

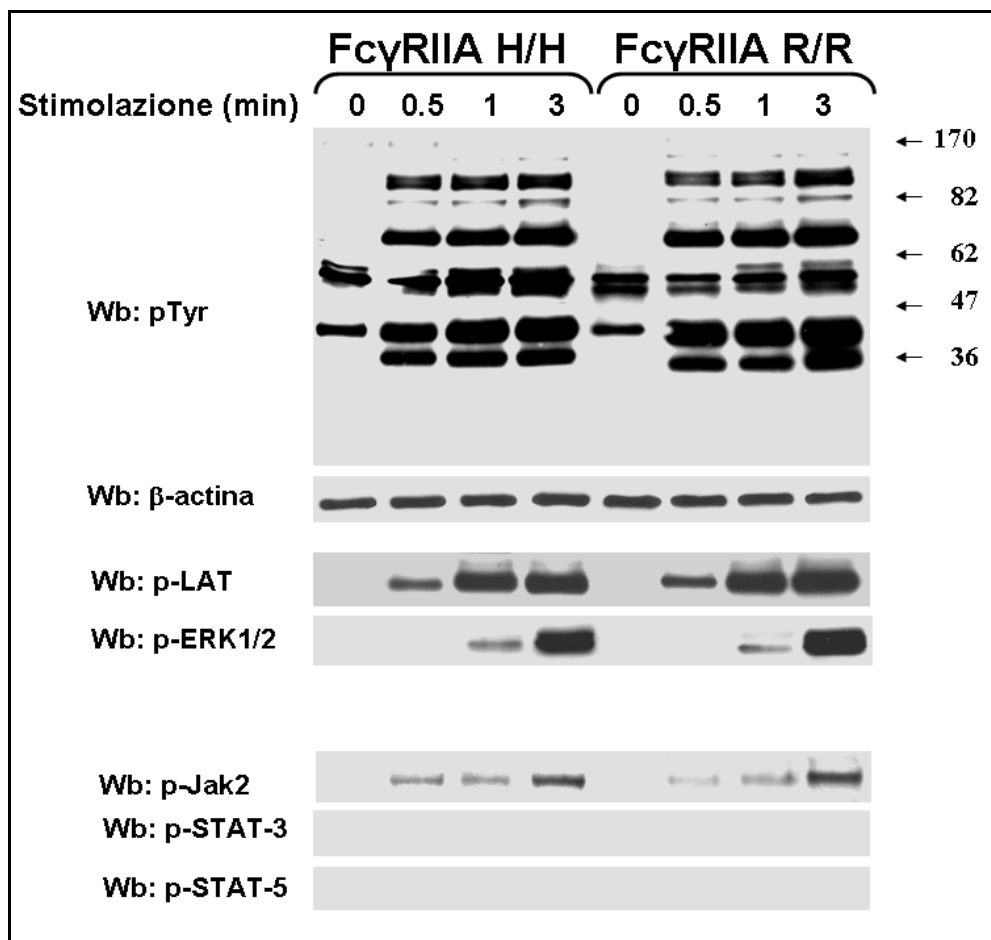
la sua localizzazione, portandosi verso la membrana esterna ed assumendo una conformazione più organizzata rispetto alle condizioni basali.

**Stimolazione del recettore FcγRIIA di piastrine di donatori FcγRIIA H/H e FcγRIIA R/R.** Successivamente è stato aggiunto il cross-linkante, dopo 2 minuti di incubazione con mAb IV.3. La figura 30 non rivela delle significative differenze nel quadro fosfotirosinico tra piastrine lavate di donatori FcγRIIA H/H e FcγRIIA R/R.

Al tempo zero vi è una evidente banda relativa alla fosforilazione delle SFKs in quanto già attivate da mAb IV.3. Andando ad analizzare le altre proteine di nostro interesse, vediamo che LAT, inizia ad essere fosforilata dopo 30 secondi raggiungendo un segnale importante ai 2 minuti.

La fosforilazione di JAK2 e ERK1/2 sono eventi più tardivi e comunque di entità simile nei due tipi di donatori. Importante è sottolineare che questa è la prima volta che JAK2 è trovata attiva dopo stimolazione di FcγRIIA anche se è difficile comprendere il suo ruolo visto che STAT 3 e 5 non sono fosforilate.

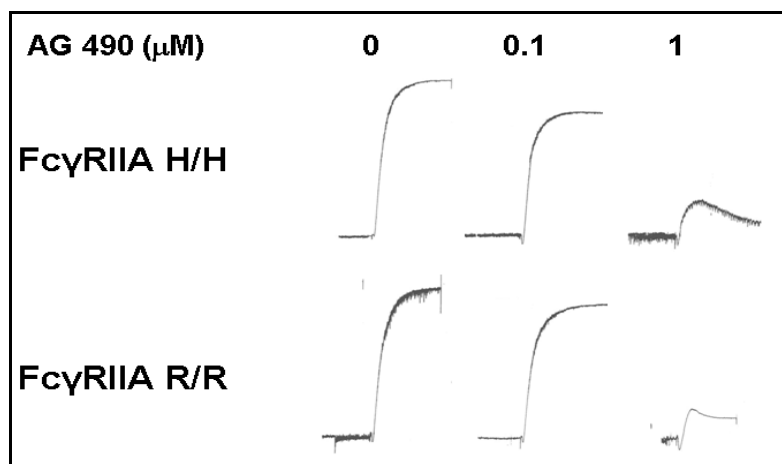
La fosforilazione di tutte queste proteine è inibita da PP2, inibitore delle SFKs; indicando che la cascata del signaling dipende delle SFKs (dati non mostrati). Questi risultati dimostrano che manca una correlazione tra polimorfismi FcγRIIA-H/H e FcγRIIA-R/R e signaling intracellulare dopo “cross-linking” del recettore.



**Figura 30: Stimolazione del recettore Fc $\gamma$ RIIA di piastrine di donatori Fc $\gamma$ RIIA H/H e Fc $\gamma$ RIIA R/R.** Le piastrine sono state ottenute da donatori sani che presentavano uno stato omozigote per i due polimorfismi, secondo il protocollo descritto nei metodi. Le cellule sono state stimulate con mAb IV.3 2  $\mu$ g/ml per 2 minuti e successivamente è stato aggiunto il cross-linkante F(ab')<sub>2</sub>, lasciando lo stimolo agire per i tempi indicati in figura. Le piastrine sono state successivamente lisate e analizzate mediante Western blot come descritto nei metodi, con anticorpi anti p-Tyr, anti p-LAT, anti p-ERK1/2, anti p-JAK2, anti p-STAT3 e anti p-STAT5, e infine anti- $\beta$ -actina per il controllo della quantità proteica. La figura è rappresentativa degli esperimenti condotti su 11 donatori Fc $\gamma$ RIIA H/H e 10 donatori Fc $\gamma$ RIIA R/R.

**Effetto dell'inibizione di JAK2 sull'aggregazione piastrinica indotta dalla stimolazione di Fc $\gamma$ RIIA dopo “cross-linking”.** Per valutare il significato della fosforilazione di JAK2 determinata dalla stimolazione e attivazione del recettore Fc $\gamma$ RIIA, è stata monitorata l'aggregazione piastrinica in assenza e in presenza dell'inibitore di JAK2 AG490. Le piastrine lavate di donatori Fc $\gamma$ RIIA H/H e Fc $\gamma$ RIIA R/R sono state pre-incubate con concentrazioni crescenti di AG490 e successivamente stimulate con l'anticorpo monoclonale IV.3 cross-linkato con F(ab')<sub>2</sub>. Come si può notare in figura 31, l'intensità dell'aggregazione

diminuisce con l'aumentare della concentrazione di inibitore e non si evidenziano differenze di comportamento tra le piastrine dei due tipi di donatori.



**Figura 31: Effetto di AG490 sull'aggregazione piastrinica dopo stimolazione con FcγRIIA.** Le piastrine sono state pre-incubate in presenza o in assenza dell'inibitore di JAK2, AG490, utilizzato alle concentrazioni 0,1 a 1 μM per 5 minuti. Successivamente è stato aggiunto mAb IV.3 2 μg/ml per 2 minuti e quindi F(ab')<sub>2</sub>. Gli stimoli sono stati eseguiti in condizioni termostattate, a 37°C, e in costante agitazione e l'aggregazione è stata monitorata mediante l'aggregometro Elvi Logos per 5 minuti.

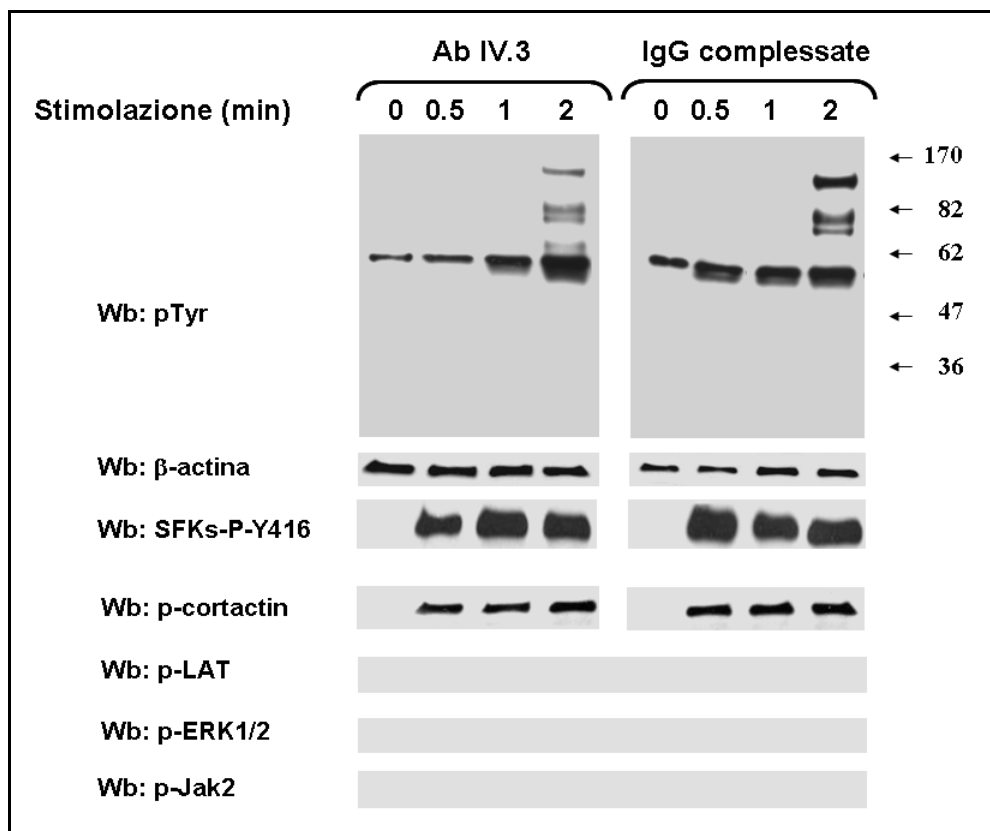
**Stimolazione di piastrine con IgG complessate.** Le IgG possiedono nella loro struttura diversi tipi di motivi, che facilitano l'interazione con molti ligandi. La struttura peculiare dei domini presenti nelle IgG, combinata con l'estrema flessibilità delle molecole di IgG, è in grado di spiegare la loro capacità di formare complessi con così tanti ligandi. I complessi di molecole di IgG coinvolti nell'interazione attraverso i domini C delle immunoglobuline stesse sono chiamati complessi "non-immuno", per distinguerli dagli "immuno" formati mediante i siti leganti l'antigene localizzati nei domini V (Nezlin R., 2009). È stato dimostrato che le molecole di IgG possono interagire tra di loro, grazie ai siti localizzati sia nelle regioni Fab sia nelle regioni Fc presenti nella loro struttura formando dei complessi (Nezlin R., 2010) che si possono indurre in vitro con trattamento al calore (62°C) di IgG purificate.

Nelle piastrine FcγRIIA possiede una bassa affinità per le IgG monomeriche ma alta affinità per le IgG complessate (Van de Winkel J.G. and Capel P.J., 1993). Recenti studi hanno dimostrato che complessi di IgG, aggregati mediante calore, non portano ad aggregazione piastrinica anche se inducono una parziale



attivazione piastrinica (Antczak A.J. et al., 2010). In seguito a questa interazione le piastrine subiscono lievi cambiamenti di forma e i complessi di IgG vengono internalizzati mediante endocitosi (Worth R.G. et al., 2006).

Il lavoro di questa parte di tesi è quindi proseguito alla luce di questi dati di letteratura e in seguito ai risultati fino ad ora descritti, per verificare se l'interazione di Fc $\gamma$ R1IA con mAb IV.3 potesse essere paragonata a quella dei complessi di IgG. A tale scopo sono state confrontate le vie di segnale attivate dopo stimolazione delle piastrine con i due tipi di stimoli. Come si può osservare in figura 32, il quadro fosfotirosinico è molto simile nelle due condizioni sperimentali e soprattutto entrambi presentano una attivazione di Src molto forte.

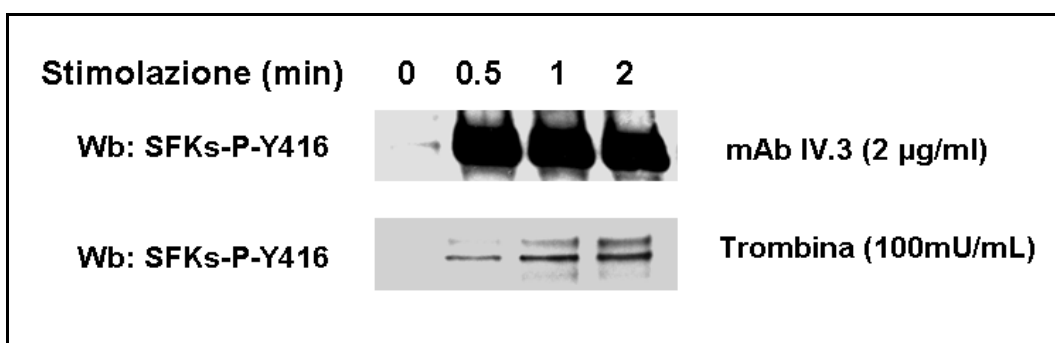


**Figura 32: Stimolazione di piastrine di donatori con IV.3 e IgG complessate.**

Le piastrine sono state ottenute da donatori sani che presentavano uno stato eterozigote per Fc $\gamma$ R1IA, secondo il protocollo descritto nei metodi. Nel pannello di sinistra sono riportati i risultati ottenuti in seguito a stimolazione con mAb IV.3 2  $\mu$ g/ml per i tempi indicati; le piastrine sono state successivamente lisate e analizzate mediante Western blot come descritto nei metodi, con anticorpi anti p-Tyr, anti SFKs-P-Y416, anti-P-cortactina, anti p-LAT, anti p-ERK1/2 e anti p-JAK2, e infine anti- $\beta$ -actina per il controllo della quantità proteica. La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 4 volte. Nel pannello di destra sono riportati i risultati ottenuti in seguito a stimolazione con IgG complessate per i tempi indicati. Le IgG per la stimolazione sono state preparate utilizzando delle IgG monomeriche umane commerciali (Sigma): 10 mg/ml di IgG sono state fatte aggregare mediante riscaldamento a 62°C in PBS per 20 minuti. Successivamente gli

aggregati insolubili sono stati precipitati mediante centrifugazione (10000g per 10 minuti). La frazione solubile contenente i complessi di IgG è stata utilizzata per lo stimolo, alla concentrazione di 50 µg/ml. Le piastrine sono state successivamente lisate e analizzate mediante Western blot come descritto nei metodi, con anticorpi anti p-Tyr, anti SFKs-P-Y416, anti-P-cortactina, anti p-LAT, anti p-ERK1/2 e anti p-JAK2, e infine anti-β-actina per il controllo della quantità proteica. La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 4 volte.

Per valutare l'entità dell'attivazione Src è stata paragonata la risposta all'anticorpo contro la forma attiva di Src dopo stimolazione con mAb IV.3 e complessi di IgG con quella di trombina, nota per determinare una consistente stimolazione di Src. Come si può osservare in figura 33, la differenza di attivazione Src tra i diversi tipi di stimoli è molto evidente e in parte difficilmente giustificabile. Dopo stimolazione con mAb IV.3 e complessi di IgG non viene infatti registrata fosforilazione di ITAM del recettore, cui dovrebbe seguire il reclutamento delle molecole responsabili della propagazione del segnale a valle e aggregazione piastrinica.

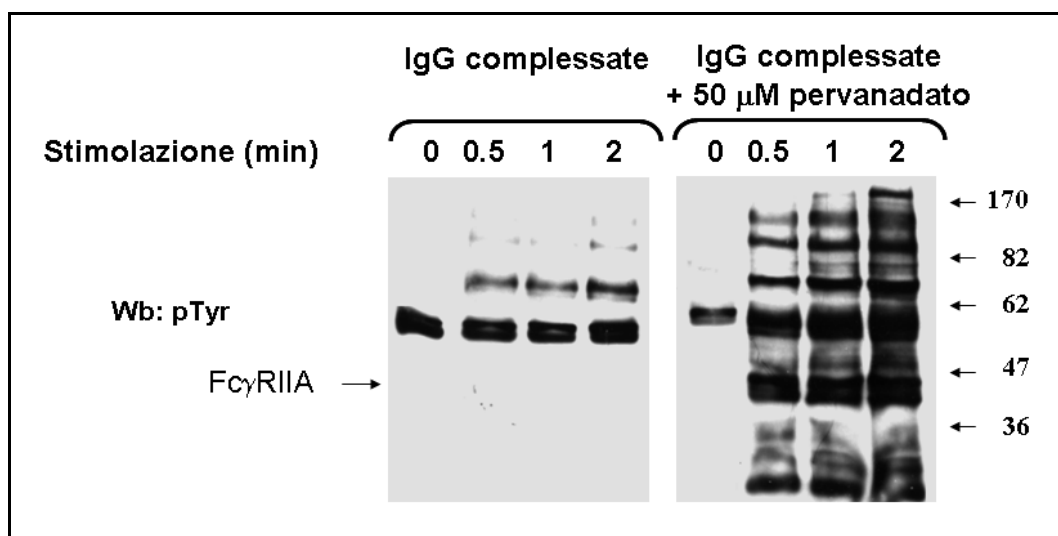


**Figura 33: Fosforilazione di Src in Y416 indotta da mAb IV.3 e da trombina.**

Le piastrine sono state ottenute da donatori sani che presentavano uno stato eterozigote per FcγRIIA, secondo il protocollo descritto nei metodi. In alto sono riportati i risultati ottenuti in seguito a stimolazione con mAb IV.3 2 µg/ml per i tempi indicati, in basso quelli relativi alla stimolazione con trombina 100 mU/ml. Le piastrine sono state successivamente lisate e analizzate mediante Western blot come descritto nei metodi, con anticorpo anti-SFKs-P-Y416. La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 3 volte.

Per comprendere i meccanismi molecolari che vengono attivati nella piastrina per impedire la fosforilazione di ITAM nonostante l'attivazione di Src, è stata verificata l'ipotesi dell'intervento di un'attività fosfatase responsabile di mantenere defosforilato ITAM di FcγRIIA bloccando l'attivazione a monte. Piastrine lavate di donatori sani sono state pre-incubate con concentrazioni crescenti di pervanadato, un inibitore aspecifico delle PTPs, e successivamente stimulate a tempi crescenti con mAb IV.3 e con IgG complesstate. Nei

corrispondenti lisati piastrinici è stato analizzato lo stato fosfotirosinico complessivo e di particolari proteine quali Src, cortactina, Fc $\gamma$ RIIA, LAT e Jak2. I risultati riportati in figura 34 mostrano chiaramente l'effetto di un'attività fosfataseca dopo stimolazione piastrinica con mAb IV.3 e con IgG complessate, permettendo di spiegare la mancata fosforilazione del recettore nonostante l'attivazione di Src.



**Figura 34: Effetto dell'inibizione fosfataseca sulla fosforilazione tirosinica in seguito a stimolazione piastrinica con IgG complessate.**

Le piastrine sono state ottenute da donatori sani che presentavano uno stato eterozigote per Fc $\gamma$ RIIA, secondo il protocollo descritto nei metodi. Le cellule sono state pre-incubate in presenza o in assenza di pervanadato 50  $\mu$ m per 10 minuti e in seguito stimolate con IgG complessate per i tempi indicati. Le IgG per la stimolazione sono state preparate utilizzando delle IgG monomeriche umane commerciali (Sigma): 10 mg/ml di IgG sono state fatte aggregare mediante riscaldamento a 62°C in PBS per 20 minuti. Successivamente gli aggregati insolubili sono stati precipitati mediante centrifugazione (10000g per 10 minuti). La frazione solubile contenente i complessi di IgG è stata utilizzata per lo stimolo, alla concentrazione di 50  $\mu$ g/ml. Le piastrine sono state successivamente lisate e analizzate mediante Western blot come descritto nei metodi, con anticorpo anti p-Tyr. La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 4 volte.

L'utilizzo di inibitori con un diverso grado di specificità ci ha consentito di avanzare l'ipotesi che la PTP coinvolta possa essere PTP1B (dati non mostrati). Nelle stesse condizioni sperimentali il monitoraggio dell'aggregazione piastrinica ha confermato gli stessi risultati, cioè che l'inibizione dell'attività fosfataseca con un inibitore a diversa specificità determina aggregazione piastrinica (dati non mostrati).

Questi risultati suggeriscono come la mancata aggregazione piastrinica in seguito al legame delle IgG complessate a Fc $\gamma$ RIIA possa essere dovuta all'attivazione di

una attività fosfataseica, con ogni probabilità di PTP1B, la quale potrebbe assicurare la specificità del segnale defosforilando FcγRIIA-ITAM con mancato reclutamento in membrana di Syk. Ulteriori indagini sono necessarie per chiarire quale possa essere il meccanismo molecolare implicato in questo processo e quale il suo ruolo fisiologico, in particolare per la possibilità di determinare nuove strategie terapeutiche per la cura e la prevenzione delle reazioni patologiche di tipo autoimmune.

## ***5 Discussione***

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una reazione immunologica avversa dovuta alla terapia eparinica; i pazienti infatti sviluppano anticorpi contro il complesso PF4/eparina con conseguente generazione di microparticelle piastriniche, attivazione di monociti e cellule endoteliali e attivazione della cascata coagulativa, con generazione massiva di trombina. Gli immunocomplessi attivano le piastrine principalmente attraverso il legame con il recettore FcγRIIA, recettore a bassa affinità per le IgG appartenente alla famiglia dei FcγRs, di cui è l'unico ad essere stato individuato sulle piastrine umane. FcγRIIA è una glicoproteina transmembrana di 40 kDa e contiene due motivi Ig-like nella porzione extracellulare e un motivo ITAM nella regione citoplasmatica, indispensabile per l'attivazione dell'FcγRIIA. Fin'ora è stato caratterizzato un solo polimorfismo del recettore FcγRIIA, all'interno del secondo dominio Ig-like, una sostituzione aminoacidica in posizione 131 da un'Istidina (H) a un'Arginina (R). Le frequenze alleliche di H e R sono circa uguali; R131 e H131 sono codominanti nella popolazione europea e le frequenze dei due genotipi omozigoti sono del 25% e dell'eterozigote H/R del 50%; inoltre il genotipo H/H viene generalmente considerato come "high-binding" per le IgG<sub>2</sub>; mentre R/R è "low-binding".

In questa parte di tesi del lavoro è stata inizialmente valutata l'influenza del polimorfismo di FcγRIIA H131R sulle vie di signaling intracellulare indotte dagli immunocomplessi, utilizzando un anticorpo, mAb IV.3, inibitore di FcγRIIA che, se cross-linkato con il frammento F(ab')<sub>2</sub>, è in grado di mimare il legame del recettore con gli immunocomplessi tipici della HIT. La valutazione della

fosforilazione di diverse proteine coinvolte nel signaling a valle del recettore ha permesso di escludere che il polimorfismo possa in qualche modo determinare una diversa attivazione piastrinica. Nel corso degli esperimenti è stata però evidenziata per la prima volta la fosforilazione di JAK2 in seguito a stimolazione di FcγRIIA, chinasi ampiamente descritta nella prima parte di questo lavoro di tesi. AG490, un inibitore specifico per JAK2, rende meno responsive allo stimolo del recettore le piastrine con conseguente diminuzione della loro capacità aggregativa. Tuttavia è difficile comprendere il ruolo di JAK2 nel signaling a valle di FcγRIIA, in quanto i suoi substrati STAT 3 e STAT 5 non sono risultati essere fosforilati

Interessante è stato notare che la sola stimolazione con mAb IV.3 determina una evidente banda relativa alla fosforilazione delle SFKs, a livello della tirosina attivatoria (Y416). Un'indagine più approfondita ha rivelato anche la fosforilazione di cortactina, proteina coinvolta nel rimodellamento di actina e quindi nel riarrangiamento citoscheltrico, ma non dell'ITAM di FcγRIIA e di altre proteine a valle del signaling indotto dall'attivazione del recettore. Inoltre, la valutazione dello spreading piastrinico su substrato mAb IV.3 ha evidenziato come l'actina modificasse la sua localizzazione, portandosi verso la membrana esterna ed assumendo una conformazione più organizzata rispetto alle condizioni basali.

Alla luce dei risultati ottenuti, che hanno cambiato la prospettiva sul ruolo del mAb IV.3, fino ad ora considerato solo un inibitore di FcγRIIA, è stata indagata l'esistenza di un elemento fisiologico che potesse determinare degli eventi analoghi. Poiché FcγRIIA è il recettore per le IgG delle piastrine ed è noto dalla letteratura che le molecole di IgG possono formare dei complessi grazie a particolari siti presenti nella loro struttura, sono stati riproposti gli schemi di stimolazione effettuati con il mAb IV.3, ottenendo risultati molto simili, con una fosforilazione marcata di Src in tirosina attivatoria, una parziale attivazione citoscheletrica e mancata fosforilazione di FcγRIIA del recettore e delle proteine a valle del recettore, indispensabili all'aggregazione piastrinica.

Per comprendere i meccanismi molecolari che vengono attivati nella piastrina per impedire la fosforilazione di ITAM nonostante l'attivazione di Src, è stata

avanzata l'ipotesi che in questo sistema potesse essere coinvolta un'attività fosfatase, responsabile dello stato defosforilato ITAM di Fc $\gamma$ RIIA e della mancata attivazione del signaling a valle di questo. L'inibizione aspecifica delle fosfatasi seguita dalla stimolazione piastrinica sia con mAb IV.3 che con IgG complessate ha determinato una fosforilazione tirosinica generalizzata, con attivazione di molecole implicate nella funzionalità piastrinica e risultati di aggregazione sorprendenti. L'utilizzo di inibitori con un diverso grado di specificità ci ha consentito di avanzare l'ipotesi che la PTP coinvolta possa essere PTP1B, descritta in letteratura come la fosfatase più abbondante a livello di piastrine, in quanto rappresenta lo 0.2% della totalità delle proteine solubili, quasi quanto le SFKs (Ragab A. et al., 2003); gli esperimenti preliminari condotti in presenza di una inibizione di PTP1B hanno dato risultati analoghi a quelli ottenuti in precedenza. PTP1B potrebbe essere quindi l'elemento chiave in grado di assicurare la specificità del segnale, defosforilando Fc $\gamma$ RIIA-ITAM e determinando il mancato reclutamento in membrana di Syk. Ulteriori indagini sono necessarie per chiarire quale possa essere il meccanismo molecolare implicato in questo processo e quale il suo ruolo fisiologico, in particolare per la possibilità di determinare nuove strategie terapeutiche per la cura e la prevenzione delle reazioni patologiche di tipo autoimmune. Inoltre non è da escludere che questi nuovi dati siano correlati in qualche modo a quello che è il ruolo delle piastrine nella clearance della risposta immunitaria, proposto dalla recente letteratura.

# *Terza parte*





## ***1 Fibrosi epatica***

La fibrosi epatica costituisce un'alterata risposta riparativa a stimoli nocivi cronici, tra i quali infezioni da virus, abuso di bevande alcoliche, eccesso di rame o ferro, ostruzione biliare e NASH (non - alcoholic steatohepatitis) (Friedman S. L., 1998). La progressione della fibrosi conduce al completo sovvertimento strutturale della normale architettura del fegato e quindi della sua funzione, caratterizzandone l'evoluzione verso la cirrosi e le sue complicanze. Generalmente, a seguito di un danno acuto che provoca la morte della cellula epatica, le cellule parenchimali si rigenerano, rimpiazzando cellule necrotiche e apoptotiche. Tuttavia, se la causa primaria del danno persiste, il fegato perde la sua capacità rigenerativa e gli epatociti vengono rimpiazzati da matrice extracellulare (ECM) (Mitaka T. et al., 1999).

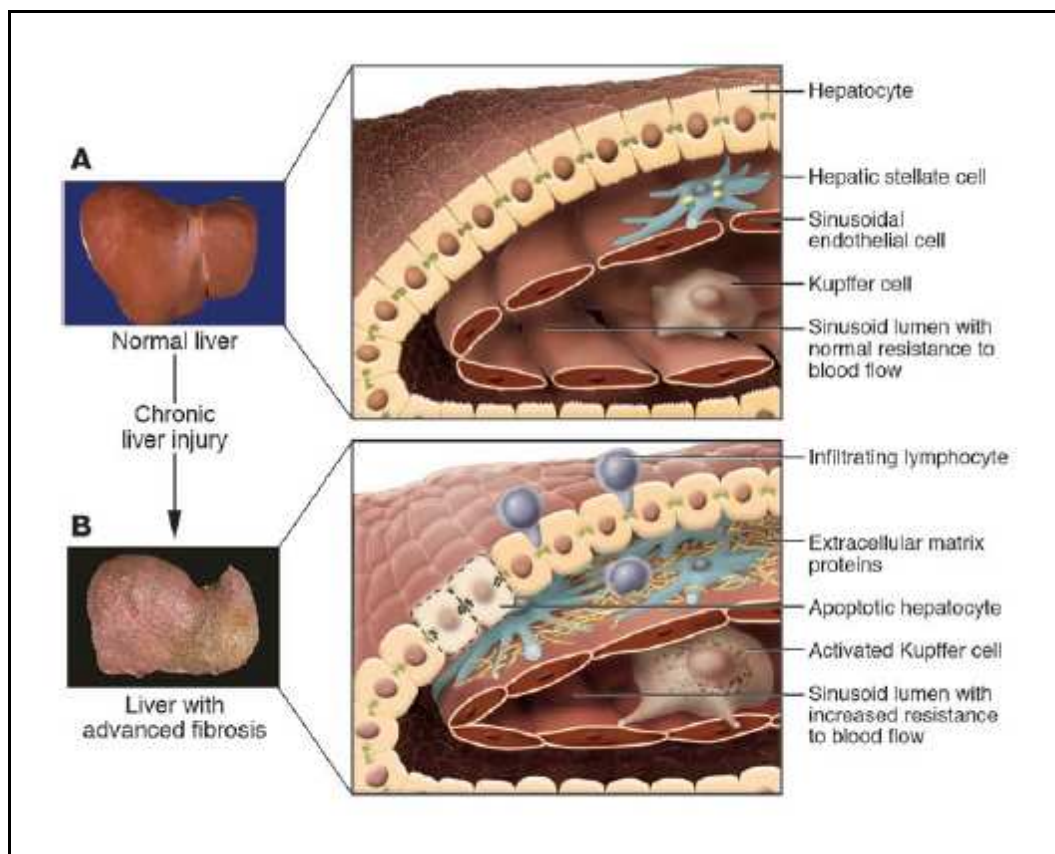
Il processo fibrogenico si caratterizza con un cambio qualitativo e quantitativo della membrana basale situata nello spazio di Disse; questa zona è interposta tra epatociti e la parete dei capillari sanguigni (sinusoidi), i quali convogliano il sangue dai rami globulari dell'arteria epatica verso la vena centrolobulare. A questo livello il plasma filtra e viene a contatto con gli epatociti, mutando la composizione non fibrillare dei collagene in fibrillare e rendendo quindi la membrana basale simile alla ECM. La quantità di collagene fibrillare aumenta dalle 3 alle 8 volte rispetto alla norma, comportando una "capillarizzazione" dei sinusoidi e dei microvilli epatocitari, ossia la perdita di fenestrazioni endoteliali che consentono lo scambio di nutrienti e sostanze di rifiuto tra epatociti e sangue (Bataller R. and Brenner D.A., 2005).

Fino ad oggi la terapia vincente per i pazienti affetti da fibrosi epatica è stata la rimozione dell'agente eziologico della patologia (disintossicazione da alcol o terapie antivirali in caso di epatiti) e, nei casi di malattia in stadio avanzato, il trapianto, non esente comunque da possibili complicanze di carattere infettivo o immunitario (rigetto). Tuttavia, negli ultimi anni le indagini sui meccanismi biochimici che portano alla manifestazione della patologia e gli studi clinici hanno dimostrato che la fibrosi può revertire a fisiologia; queste nuove evidenze hanno aperto strade alternative nella cura della patologia, volte all'individuazione di

terapie farmacologiche efficaci in grado di riportare l'organo in condizioni fisiologiche.

## ***2 Cellule stellate***

**Caratteristiche e ruolo nella fibrosi.** La popolazione cellulare epatica principalmente coinvolta nel processo fibrogenico è costituita dalle cellule epatiche stellate, denominate HSCs; quando sottoposte a stimolo lesivo cronico, esse vanno incontro ad un processo di attivazione, passando da un fenotipo quiescente non proliferante ad uno altamente proliferante, con spiccata sintesi di proteine della matrice e, in particolare, di collagene fibrillari. Queste cellule sono localizzate nel parenchima all'interno dello spazio di Disse, e rappresentano il 5-8 % delle cellule presenti in un organo sano. La caratteristica da cui prendono il nome è data dalla presenza di estensioni citoscheletriche, costituite da proteine filamentose e microtubuli. Grazie a tali prolungamenti, le HSCs entrano a diretto contatto con epatociti, ECM, endotelio e terminazioni nervose circostanti (Knittel T., 1999). In un fegato sano queste cellule sono le principali produttrici di collagene e di proteine di matrice extracellulare mentre, in presenza di un stimolo dannoso, assumono un fenotipo simile a quello dei miofibroblasti, caratterizzato da un'alta espressione della proteina citoscheletrica  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -actina del muscolo liscio), che aumenta la capacità contrattile della cellula e ne facilita la migrazione in presenza di stimoli chemotattici, ad esempio stimoli che la fanno migrare in prossimità di un danno tissutale (Guyot C. et al., 2006). La presenza quindi di un danno epatico le induce a proliferare e ad aumentare l'espressione dei componenti della matrice extracellulare, conferendo loro una spiccata potenzialità fibrotica (Li D. and Friedman S.L., 1999). In figura 35 vengono messi a confronto un fegato di individuo sano con un fegato di un paziente con fibrosi epatica e le modifiche che è possibile riscontrare nell'organo in seguito a danno epatico.



**Figura 35: Modifiche della struttura epatica (A) in seguito a fibrosi epatica in stato avanzato (B)** (*J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):209-18)

**Attivazione delle HSC.** Sottoposte a stimoli fibrotici, le HSC modulano il proprio pattern di espressione genica in favore di un'aumentata e diversa espressione dei componenti di natura fibrillare della ECM, modificando di conseguenza anche la propria morfologia e assumendo un fenotipo simile a quello dei miofibroblasti (Geerts A., 2001).

Nel corso dell'attivazione si individuano tre fasi principali: *initiation* (detta anche fase pre-infiammatoria) e *perpetuation*, seguite da una fase *resolution* se il danno non persiste (Friedman S.L., 2004). La *initiation* comprende le prime modificazioni nell'espressione genica e nel fenotipo, che rendono in tempo breve le cellule più responsive a diverse citochine e stimoli.

La stimolazione paracrina iniziale include l'esposizione ai perossidi lipidici e a prodotti degli epatociti danneggiati e segnali dalle cellule di Kupffer ed endoteliali; questi eventi portano ad una attivazione precoce delle cellule e a cambiamenti nella matrice extracellulare (figura 36).

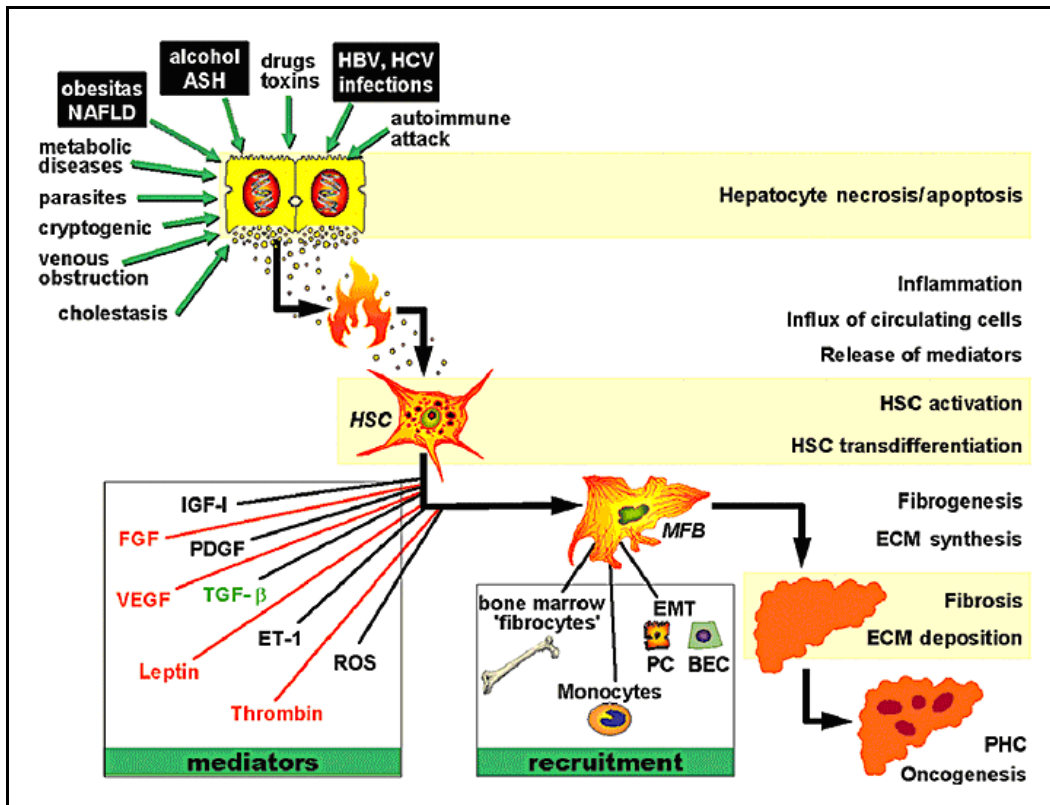


Figura 36: Eventi principali nel corso dell'attivazione delle HSCs (*J Gastroenterol Hepatol* 2008)

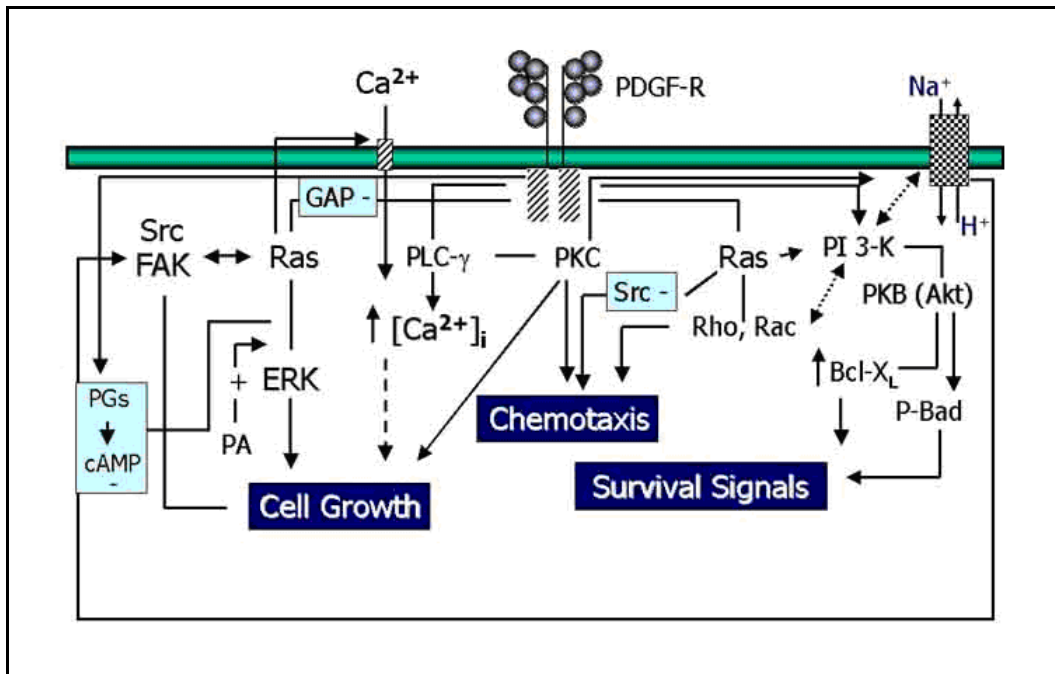
Ad una prima attivazione delle cellule segue la *perpetuation*, che risulta dagli effetti che questi stimoli hanno nel mantenere il fenotipo attivato e generare fibrosi. Una attivazione efficace determina almeno sette cambiamenti nel comportamento delle cellule: proliferazione, chemiotassi, fibrogenesi, capacità contrattile, degradazione della matrice, perdita dei retinoidi e rilascio di globuli bianchi chemiotattici e citochine. Tutto ciò porta ad un aumento nell'accumulo di matrice extracellulare. Nel corso di questa fase, vi è un rilascio di fattori pro-infiammatori, pro-fibrogenici e pro-mitogenici, che agiscono con meccanismo autocrino e paracrino. La *resolution* della fibrosi comprende infine quegli eventi che causano l'apoptosi delle HSC, la senescenza o la quiescenza (Krizhanovsky V. et al., 2008).

### ***3 La citochina PDGF***

Il PDGF, Platelet Derived Growth Factor, è un fattore di crescita di 25 kDa, secreto in particolare da piastrine attivate. Esso presenta una struttura a “nodo di cisteina”, con due ponti disolfuro che saldano due catene polipeptidiche, le quali possono essere di tipo A o B, conferendo al PDGF tre possibili forme dimeriche: AA, AB, BB. La forma BB è quella che risulta esercitare l'effetto mitogeno e pro-fibrinogeno sulle HSC (Rovida E. et al., 2007). Una volta che il PDGF-BB si lega al suo recettore, ne induce la dimerizzazione, attivando di conseguenza l'attività tirosin chinasi del recettore stesso che va incontro ad autofosforilazione. Le tirosine fosforilate fungono da siti attivi di legame per altre proteine che posseggono un dominio SH2 (Src Homology-2) o domini PTB (Phospho Tyrosine Binding Domain).

Il PDGF-BB è in grado di attivare delle cascate di traduzione del segnale (figura 37) che portano ad un aumento della capacità proliferativa (attivazione della cascata MAPK/ERK), della chemiotassi (attivazione di Rac e Rho) e all'attivazione di segnali di sopravvivenza (attivazione della via PI3-K) (Tsukada S. et al., 2005). La fosforilazione consente la traslocazione della forma attiva di ERK nel nucleo, dove può indurre, mediante fosforilazione, l'attivazione di diversi fattori di trascrizione, che favoriscono l'espressione di geni come c-fos, promotori della proliferazione cellulare. Le due GTPasi Rho e Rac sono le principali proteine regolatrici della motilità e della morfologia delle HSC; in particolare esse sono in grado di attivare chinasi come Rock (Rho kinases) e Pak (P21 Activated Kinases), che fosforilano diversi substrati coinvolti nella polimerizzazione dell'actina e nella stabilizzazione dei microtubuli. Inoltre le due GTPasi mediano le interazioni con la matrice e la formazione di adesioni focali (Fryer B.H. and Field J., 2005). La stimolazione della via PI3-K comporta l'attivazione della Ser/Thr chinasi Akt/PKB, che svolge diverse funzioni: inibisce fattori pro-apoptotici come BAD, caspasi-9 e MAP (Carlioni V., 2002); fosforila e inattiva chinasi come ASK-1, SEK-1 e MLK-3, le quali attivano la cascata delle SAPK (Stress Activated Protein Kinases), mediatrici della risposta a stress cellulari indotti da citochine; blocca molti fattori di trascrizione che ostacolano la

sopravvivenza cellulare come FoxO (Forkhead transcriptional factor), in grado di stimolare la trascrizione di Fas e attiva Rac (aumento contrattilità cellulare) (Tsukada S. et al., 2006).



**Figura 37: Rappresentazione schematica delle cascate di trasduzione del segnale attivate da PDGF-BB**

#### 4 Obiettivi

La fibrosi epatica è una patologia che comporta l'accumulo di tessuto di tipo cicatriziale nel fegato in condizioni di danno cronico. A seguito di questo evento la matrice cellulare modifica le sue caratteristiche, con un aumento di componenti fibrillari che vanno ad occupare la maggior parte dell'organo. Le HSCs (Hepatic Stem Cells) sono le principali cellule effettrici nella fibrosi epatica, in quanto coordinano la deposizione della matrice extracellulare sia nel fegato sano che in quello fibrotico. In seguito a danno epatico queste cellule vengono attivate da diverse citochine infiammatorie e modificano la loro morfologia assumendo un fenotipo simile a quello dei mio fibroblasti. L'attivazione vede una fase di iniziazione, in cui si verificano i primi cambiamenti della matrice extracellulare, modificazioni dell'espressione genica e del fenotipo e stimolazione paracrina. In seguito si ha la fase di perpetuazione in cui le HSC aumentano l'espressione di

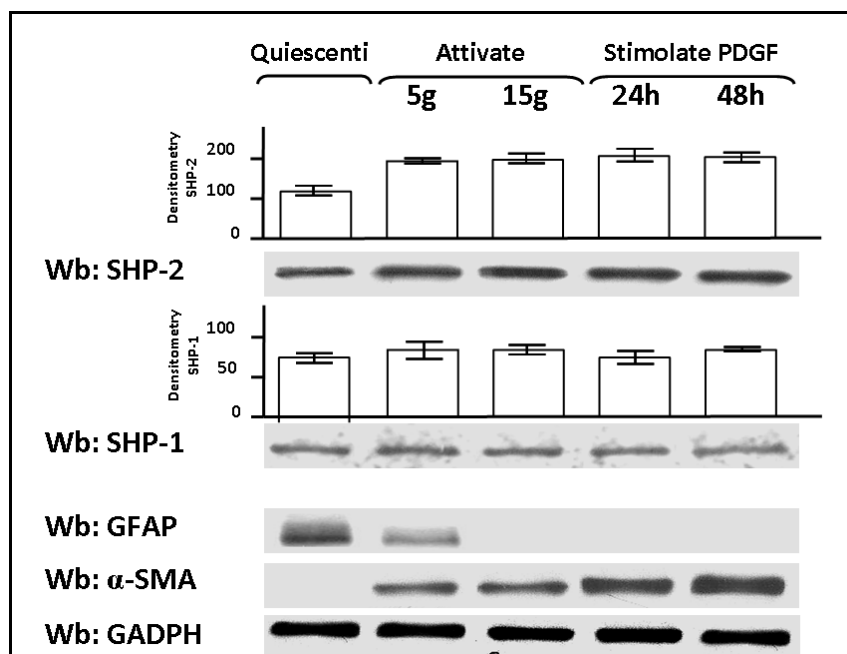
fattori mitogeni, la loro contrattilità e vi è un aumento di espressione dei recettori tirosin-chinasici. Nella fase di risoluzione infine si verificano quegli eventi che causano l'apoptosi, la senescenza o la quiescenza delle HSC. Le cellule stellate contengono dei marker biochimici, cioè proteine citoscheletriche che consentono l'individuazione del loro stato di attivazione: essi sono desmina, presente sia nelle quiescenti che nelle attivate, GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein), espressa unicamente da cellule quiescenti, e  $\alpha$ -SMA, espressa solo durante la fase di attivazione.

Il PDGF (Platelet Derived Growth Factor) è il più potente fattore mitogeno e chemiotattico per le HSCs; in seguito al legame con il suo recettore, PDGF ne induce la dimerizzazione e l'autofosforilazione e le p-Tyr fungono quindi da siti di legame per altre proteine che possiedono un dominio SH2. Le vie di segnale mediate da PDGF sono da tempo oggetto di studio in quanto rappresentano bersagli per lo sviluppo di farmaci contro la fibrosi. L'azione combinata di PTKs e PTPs determina la specificità delle cascate di segnale; inoltre le PTPs possono regolare il segnale indotto da PDGF sia positivamente che negativamente. Infatti SHP-2 e SHP-1, che possiedono entrambe due domini SH2 e presentano un'elevata identità di sequenza, si comportano in maniera opposta: SHP-2 ha un ruolo positivo in quanto partecipa alla de-inibizione della via ERK1/2, mentre SHP-1 defosforila il recettore per il PDGF ed è quindi descritta come trasduttore negativo.

Il nostro obiettivo in questo modello è stato quello di valutare il coinvolgimento di SHP-2 e SHP-1 nella risposta proliferativa di cellule HSCs in seguito a stimolazione con PDGF.

## ***5 Risultati***

**Espressione di SHP-2 e di SHP-1 nelle cellule stellate epatiche (HSCs) di ratto.** Per valutare se le HSCs di ratto esprimessero SHP-2 e SHP-1 e se il livello proteico fosse alterato durante l'attivazione in cultura senza o con stimolazione di PDGF, lisati di HSC sono stati sottoposti ad analisi di Western blot con anticorpo anti-SHP-2 e anti-SHP-1. La figura 38 mostra che entrambe le fosfatasi sono presenti in HSCs nelle condizioni sopraindicate.



**Figura 38: Valutazione dell'espressione di SHP-2 e SHP-1 nei diversi stati di differenziamento delle HSCs.**

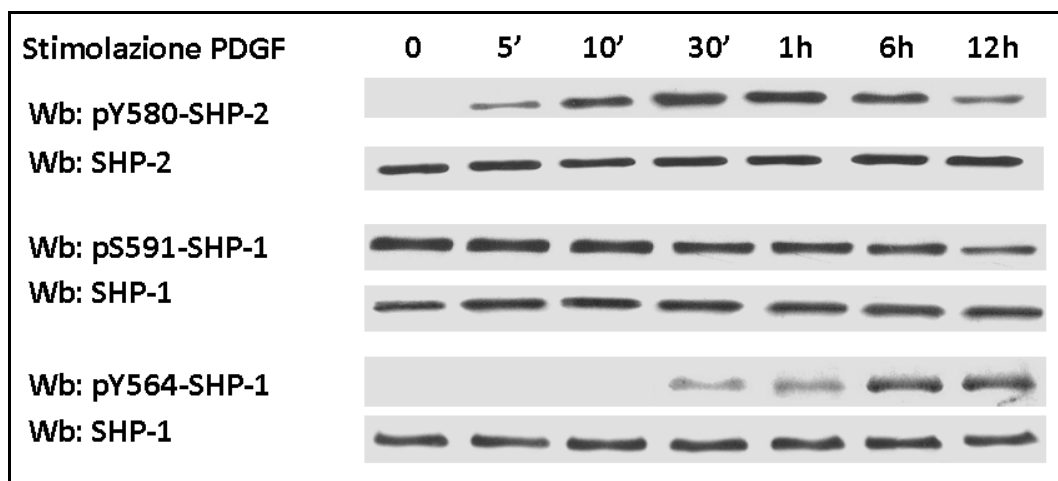
Sono state utilizzate cellule HSC di fegato di ratto in stato quiescente a 3 giorni dall'isolamento, attivate dopo 5 e 15 giorni dall'isolamento o attivate al terzo passaggio in coltura stimolate con PDGF 50 ng/ml per 24 o 48 ore. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot e rivelazione anticorpale con anticorpo anti-SHP-2 o anti-SHP-1. I lisati di cellule quiescenti sono stati sottoposti a rivelazione anticorpale con anti-GFAP, i lisati di HSCs attivate e stimolate con anti- $\alpha$ -SMA. Tutti i lisati sono stati infine analizzati con anticorpo anti-GADPH (controllo della quantità proteica). La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 6 volte.

L'espressione di SHP-2 aumenta di ~40% nelle HSCs attivate dopo 5 giorni di coltura rispetto alle HSC quiescenti e si mantiene invariata nei giorni successivi e anche dopo successiva stimolazione con PDGF; l'espressione di SHP-1, invece, non presenta una significativa variazione nelle stesse condizioni sperimentali di coltura. Lo stato di attivazione di HSCs è stato monitorato dal cambiamento di espressione di Glial Fibrillar Acidic Protein (GFAP) e  $\alpha$ - smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), quest'ultima utilizzata anche come marker per la stimolazione con PDGF (vedi introduzione). La quantificazione di gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GADPH) è stata eseguita come controllo della quantità proteica nei diversi lisati.

**Stato di attivazione di SHP-2 e di SHP-1 dopo stimolazione con PDGF di HSCs attivate.** È noto dalla letteratura che SHP-2 e SHP-1 hanno ruoli opposti nelle vie di trasduzione mediate da PDGF e che lo stato di attivazione di queste fosfatasi è determinato dalla loro fosforilazione; in particolare, per SHP-2 la



fosforilazione di Y580 attiva l'enzima, per SHP-1 la fosforilazione di S591 è inibitoria mentre la fosforilazione di Y564 è attivatoria. L'utilizzo di anticorpi ottenuti contro le diverse forme fosforilate delle due fosfatasi ha consentito di analizzare il loro stato di attivazione mediante analisi Western blot su lisati di HSCs dopo stimolazione con PDGF a tempi crescenti, compresi tra 0 e 12 ore.



**Figura 39: Analisi dello stato di attivazione di SHP-2 e SHP-1 indotto da PDGF.**

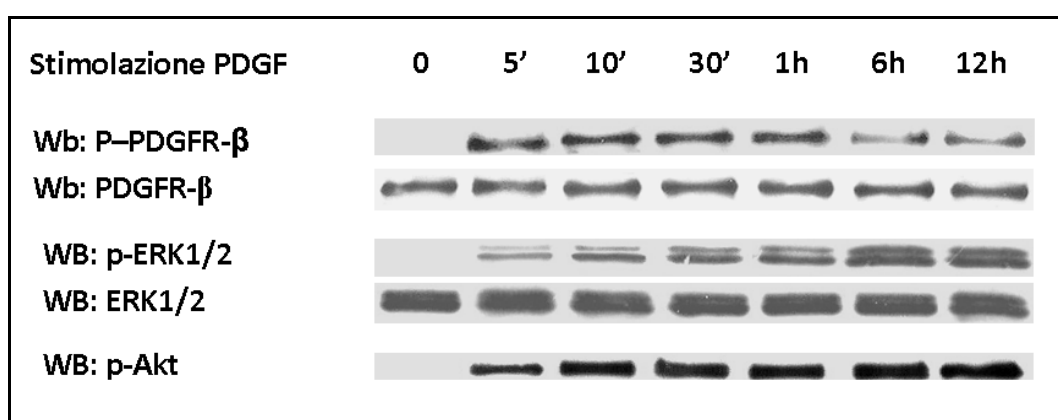
Sono state utilizzate cellule HSC di fegato di ratto attivate al terzo passaggio in coltura. Le HSCs sono state stimolate con PDGF 50 ng/ml per i tempi indicati in figura. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot e rivelazione anticorpale con anticorpi anti-SHP-2-pTyr580, o anti-SHP-1-pSer591 o anti-SHP-1-pTyr564 e in seguito con anti-SHP-2 o SHP-1 per il controllo della quantità proteica presente. La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 6 volte

Come evidenziato in figura 39, le due fosfatasi sono attivate nel corso della stimolazione con PDGF ma con una sequenza temporale molto diversa. SHP-2 è attivata già dopo 5 minuti, raggiunge il picco di massima attivazione dopo un'ora e inizia a diminuire la sua attività a partire dalle 6 ore. Per quanto riguarda SHP-1, le risposte anticorpali ottenute contro le due forme fosforilate, una in S591 inibitoria e l'altra in Y564 attivatoria, sono complementari e mettono chiaramente in evidenza come l'attivazione di SHP-1 sia un evento molto più tardivo rispetto a quella di SHP-2.

Per comprendere meglio il significato di queste due diverse attivazioni, è stato monitorato lo stato di attivazione del PDGFR e di due molecole che svolgono un ruolo chiave nel mediare le vie a valle del recettore: Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) 1/2 e Akt. Anche in questo caso lo stato di attivazione è

stato valutato mediante analisi Western blot con anticorpi contro le forme fosforilate, sinonimo di attivazione.

La figura 40 mostra come PDGFR raggiunge il massimo della sua attivazione/fosforilazione dopo soli 5 minuti e il suo declino è parallelo rispetto all'attivazione di SHP-1. Le attivazioni di ERK1/2 e di Akt sono invece eventi più tardivi, a sostegno del fatto che entrambe sono molecole molto a valle del recettore e la loro attivazione richiede l'attivazione della via Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MEK) per ERK1/2 e di PI-3K per Akt (vedi introduzione).



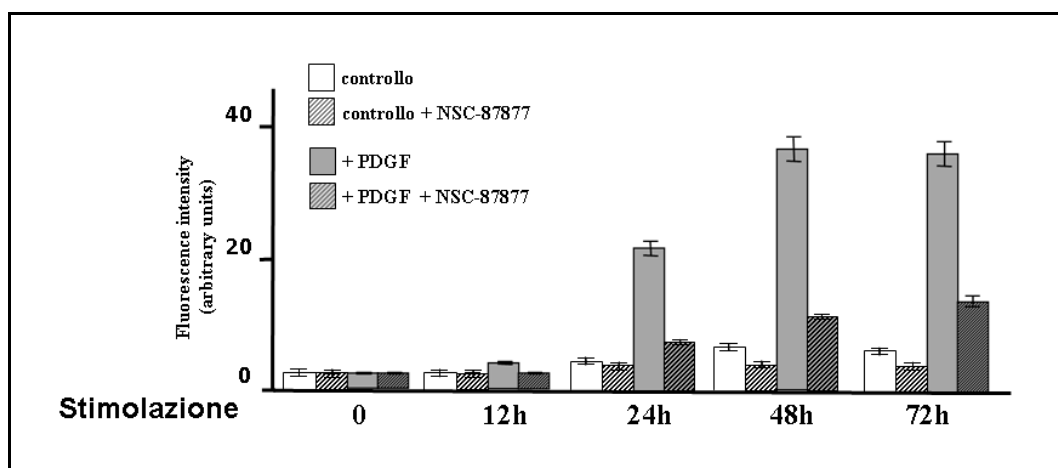
**Figura 40: Analisi dello stato di attivazione di PDGFR- $\beta$ , ERK e Akt indotto da PDGF.**

Sono state utilizzate cellule HSC di fegato di ratto attivate al terzo passaggio in coltura. Le HSCs sono state stimolate con PDGF 50 ng/ml per i tempi indicati in figura. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot e rivelazione anticorpale con anticorpo anti-p-PDGFR- $\beta$  o anti-p-ERK o anti-p-Akt e in seguito rispettivamente con anti-PDGFR- $\beta$  o anti-ERK o anti-Akt per il controllo della quantità proteica. La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 6 volte.

**Effetti dell'inibizione di SHP-2 e SHP-1 sulla proliferazione dopo stimolazione con PDGF.** Per comprendere il coinvolgimento di SHP-2 e SHP-1 nelle vie di trasduzione del segnale mediato da PDGF, sono stati dapprima valutati gli effetti dell'inibizione farmacologica delle due fosfatasi sulla proliferazione cellulare delle HSCs dopo stimolazione con PDGF. In questo lavoro è stato utilizzato un inibitore per entrambe le fosfatasi, NSC-87877, in quanto non erano disponibili inibitori specifici per le singole PTPs.

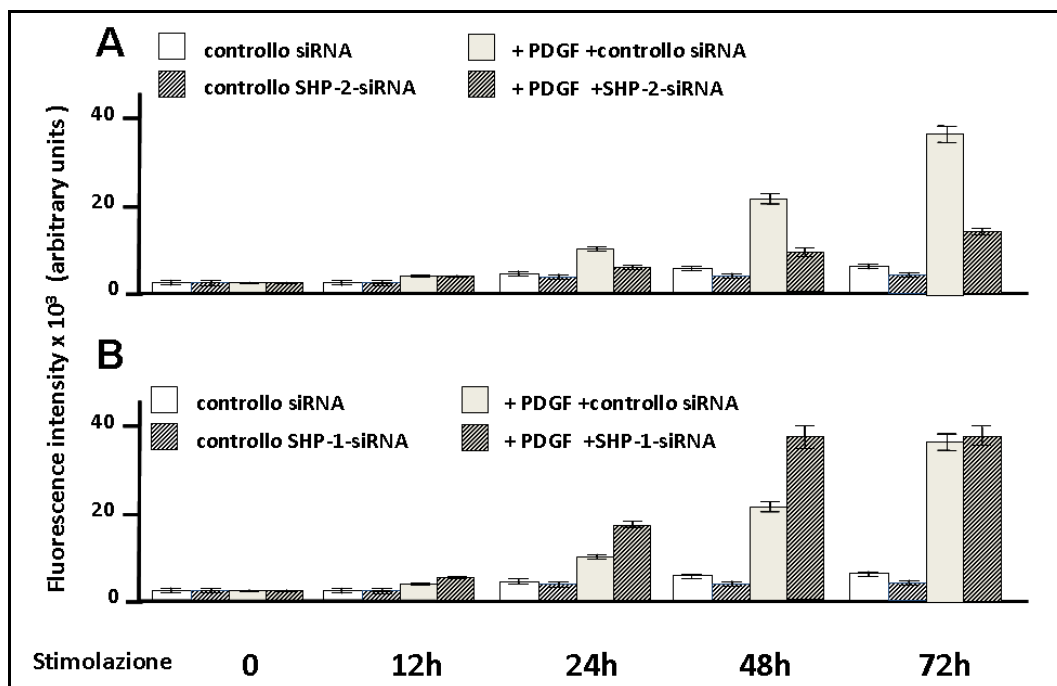
Le HSCs al terzo passaggio in coltura sono state seminate su piastre da 96 pozzetti e lasciate crescere fino al raggiungimento di una confluenza pari al 50%; quindi le cellule sono state incubate per 30 minuti in assenza o in presenza di NSC-87877

10  $\mu\text{M}$  e successivamente stimulate con PDGF per 12, 24, 48 e 72 ore; la proliferazione è stata valutata mediante l'utilizzo del Kit Delfia e quantificata come intensità di fluorescenza dell'europio misurata dallo spettrofotometro a 615 nm. La figura 41 mostra come la proliferazione cellulare di HSCs indotta da PDGF in presenza di NSC-87877 sia fortemente inibita rispetto a quella in assenza di inibitore; l'inibizione risulta essere circa del 60% dopo le 72 ore.



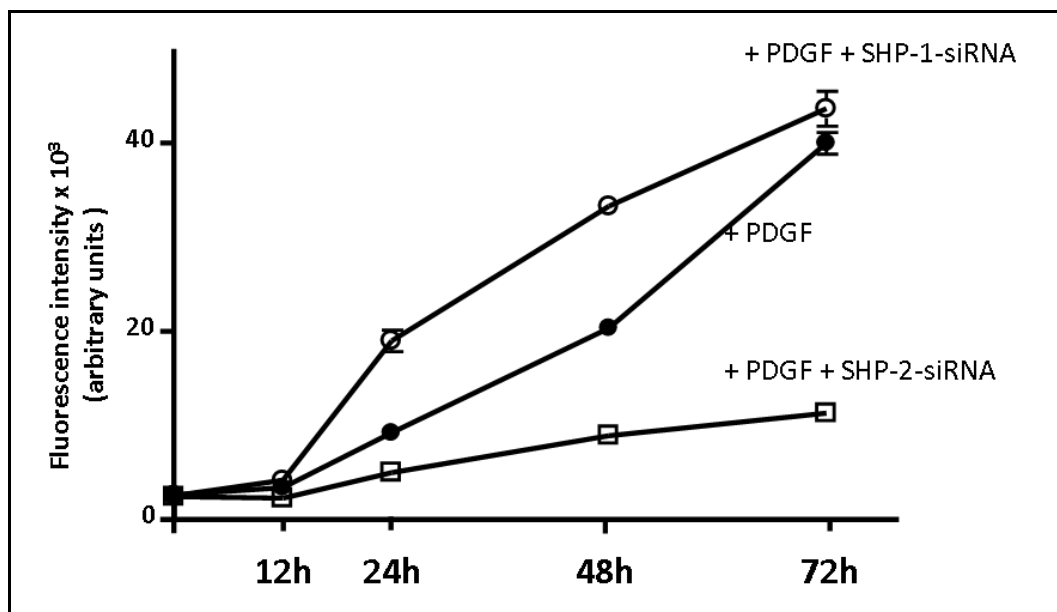
**Figura 41: stimolazione con PDGF.** Le cellule attivate in coltura al terzo passaggio sono state seminate, fatte aderire con l'aiuto di collagene su piastre da 96 pozzetti e stimulate dopo essere state per almeno 24 ore senza siero, come descritto nel capitolo dei metodi. Le cellule sono state pre-incubate in assenza o presenza dell'inibitore aspecifico per SHP-2 e SHP-1, NSC-87877, 10  $\mu\text{M}$  per 30 minuti e successivamente trattate in assenza o presenza di PDGF 50 ng/ml per i tempi indicati in figura. Allo scadere dell'incubazione, le piastre sono state processate con il Kit-Delfia per la valutazione della proliferazione, come descritto nel capitolo dei metodi.

Successivamente, per esaminare il contributo delle due fosfatasi è stata inibita l'espressione di SHP-2 e SHP-1 con utilizzo di siRNAs specifici, ed è stata quantificata la crescita cellulare. La figura 42 mostra che la ridotta espressione delle due fosfatasi ha conseguenze opposte sulla proliferazione cellulare delle HSCs dopo stimolazione con PDGF.



**Figura 42: Analisi degli effetti dell'inibizione genica di SHP-2 e SHP-1 sulla proliferazione dopo stimolazione con PDGF.** Le cellule normali o silenziate (siRNA per SHP-2 o SHP-1), attivate in coltura al terzo passaggio sono state seminate, fatte aderire su piastre da 96 pozzetti con l'aiuto di collagene e stimolate dopo essere state per almeno 24 ore senza siero, come descritto nel capitolo dei metodi. Successivamente sono state trattate in assenza o presenza di PDGF 50 ng/ml per i tempi indicati in figura. Allo scadere dell'incubazione, le piastre sono state processate con il Kit-Delfia per la valutazione della proliferazione, come descritto nel capitolo dei metodi. La figura mostra il confronto dei risultati di proliferazione cellulare in quattro situazioni, cellule come tali, cellule siRNA SHP-2 (pannello A) o siRNA SHP-1 (pannello B), cellule attivate stimolate con PDGF e cellule attivate siRNA SHP-2 (pannello A) o siRNA SHP-1 (pannello B).

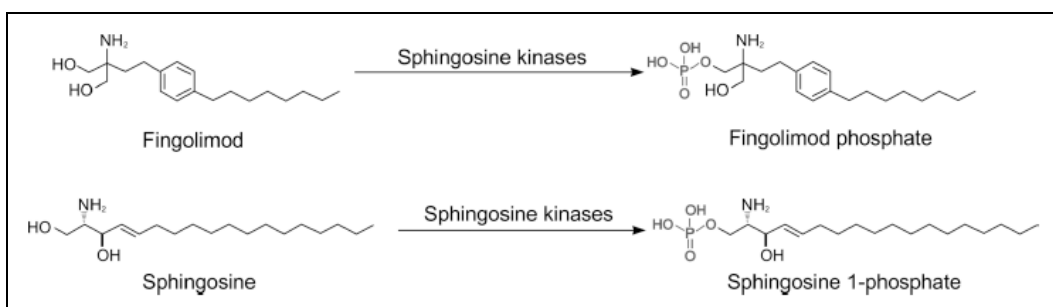
Il sensibile calo del livello proteico di SHP-2 determina una riduzione della proliferazione cellulare pari al 60% alle 72 ore (Fig.42 A) in confronto al campione stimolato con PDGF, mentre la riduzione di SHP-1 (vedi Fig.42 B) porta ad una maggiore velocità di crescita rispetto al campione stimolato con PDGF. Questi risultati, riassunti nel grafico di figura 43, sono indicativi di un diverso ruolo svolto dalle due fosfatasi nella trasduzione del segnale mediato da PDGF: positivo per SHP-2 e negativo per SHP-1.



**Figura 43: Comparazione della differenza dell'effetto sulla proliferazione dopo stimolazione con PDGF indotto dal silenziamento genico di SHP-2 o SHP-1.**

Parallelamente sono stati analizzati anche gli effetti dell'inibizione farmacologica e genetica delle due fosfatasi sullo stato di attivazione del PDGFR, di ERK1/2 e di Akt. La ridotta espressione di SHP-2 determina una drastica inibizione dello stato di fosforilazione di ERK1/2 e Akt, (dati non mostrati), coerente con il ruolo riconosciuto a SHP-2 nelle vie di trasduzione del segnale, mediato da fattori di crescita e citochine, di promuovere l'attivazione della via di segnale Ras/Raf/MEK/ERK1/2, con conseguente cambio dell'espressione genica richiesto per indurre la proliferazione. Inoltre, la trascurabile variazione dello stato di fosforilazione di PDGFR valutata dall'inibizione di SHP-2 conferma che questa PTP si colloca a valle del PDGFR. Al contrario, l'aumento dello stato di fosforilazione di PDGFR determinato dalla ridotta espressione di SHP-1 spiega l'attivazione delle vie di segnale a valle del recettore, l'aumentata attivazione sia di ERK1/2 che di Akt ed indica che questa fosfatasi ha un'azione diretta sullo stato di fosforilazione di PDGFR. (dati non mostrati). Dall'analisi di questi risultati emerge chiaramente l'importanza di SHP-2 e SHP-1 nelle vie di segnale mediate dal PDGF e si intuisce come entrambe le fosfatasi, anche se con azioni diverse, siano da prendere in considerazione quali possibili bersagli di farmaci con azione anti-fibrotica.

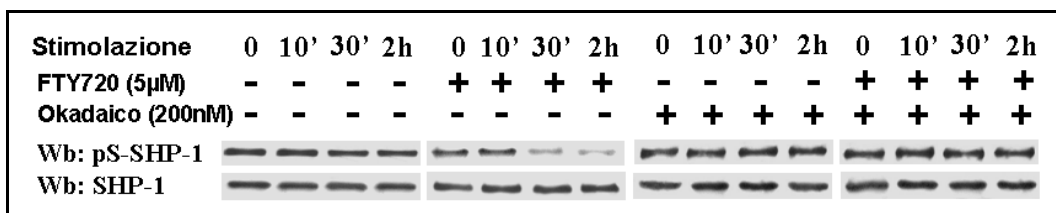
**Attivazione di SHP-1 dall'asse FTY720/PP2A nelle HSCs.** I dati precedentemente descritti hanno dimostrato che il livello della fosforilazione tirosinica di PDGFR, dal quale dipende l'attivazione delle vie di segnale a valle, non è solo determinato dall'attività chinastica del recettore stesso ma anche dall'azione concertata e opposta delle PTPs; inoltre, poichè in questo lavoro è stato visto che SHP-1 è in grado di defosforilare il recettore, è stato valutato se molecole con azione attivatoria su SHP-1 possano esercitare un effetto inibitorio sulla stimolazione indotta da PDGF nelle HSCs. FTY720 (Fingolimod), analogo sintetico di miriocina strutturalmente simile alla sfingosina (figura 44), è noto quale immunomodulatore correntemente valutato in fase III di trials clinici per la sclerosi multipla, e possiede i requisiti per essere utilizzato in questo lavoro come attivatore di SHP-1.



**Figura 44: Struttura di FTY720** (Fingolimod, 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol).

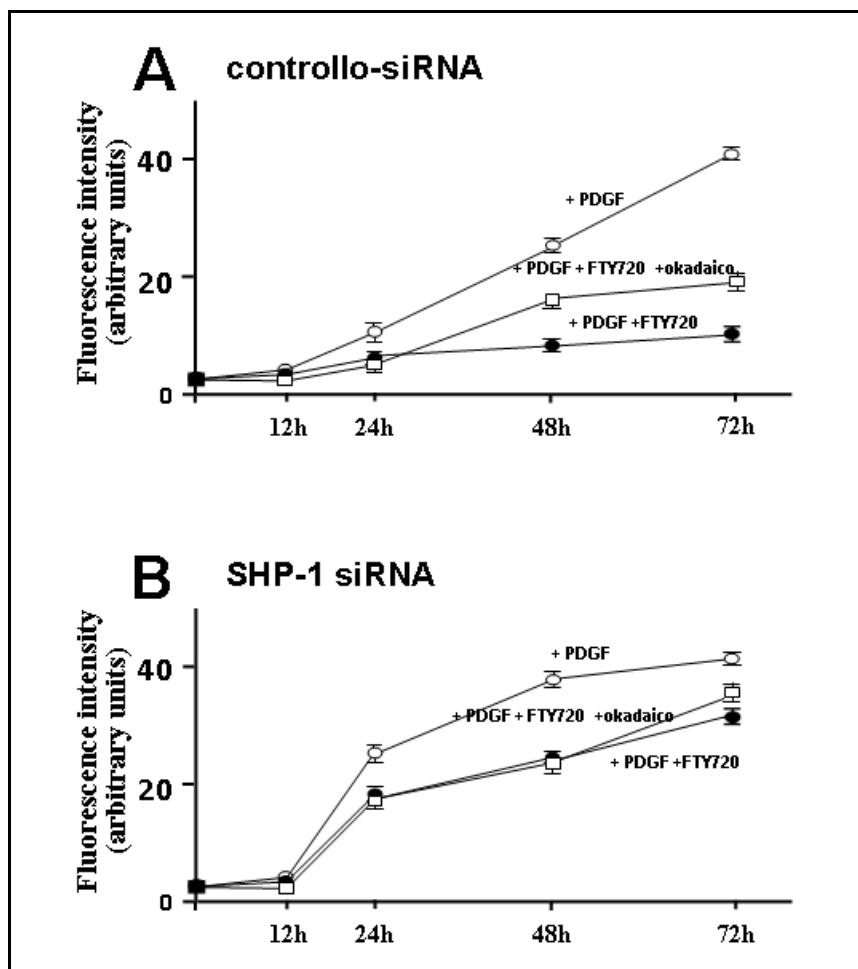
Infatti questo composto è stato dimostrato essere un attivatore della Ser/Thr protein fosfatasi PP2A la quale è in grado di defosforilare la Ser591 di SHP-1, rimuovendo l'azione inibitoria esercitata da questo residuo fosforilato sull'attività di SHP-1 (Korporaal S.J. et al., 2008; Chen K.F. et al., 2010). Inoltre un recente lavoro del nostro gruppo (Brunati A.M. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2008) dimostra che FTY720 inibisce la proliferazione cellulare di HSCs dopo stimolazione con PDGF, agendo sia come competitore dei recettori della sfingosina 1-fosfato (S1P) che come inibitore del livello di fosforilazione del PDGFR, anche se il meccanismo di questa inibizione non è ancora stato indagato. Allo scopo di valutare l'azione di FTY720 sullo stato di attivazione di SHP-1, lisati di HSCs, ottenuti dopo stimolazione con PDGF a tempi diversi in assenza o

in presenza di 5 $\mu$ M FTY720, sono stati sottoposti ad analisi di Western blot con anticorpo anti-pS591SHP-1 e successivamente, con anticorpo anti-SHP-1. È stata anche considerata l'azione della PP2A, utilizzando acido okadaico 200 nM, noto inibitore specifico di questa fosfatasi. La figura 45 mostra chiaramente che lo stato di fosforilazione della Ser591 è PP2A-dipendente e che FTY720 esercita un'azione attivatoria PP2A-dipendente su SHP-1.



**Figura 45: Valutazione della fosforilazione di SHP-1 in serina 591 in presenza di FTY720 e/o acido okadaico.** Sono state utilizzate cellule HSC di fegato di ratto attivate e al terzo passaggio in coltura. Le cellule sono state stimulate con PDGF 50 ng/ml a diversi tempi, indicati in figura, in presenza o meno di una pre-incubazione di 30 minuti con FTY720 5  $\mu$ M e/o acido Okadaico 200 nM, secondo lo schema illustrato in figura. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot e rivelazione anticorpale con anticorpo anti-p-Ser591-SHP-1 e anti-SHP-1. La figura è il risultato di esperimenti ripetuti 6 volte.

La figura 46 mette invece in evidenza come l'azione inibitoria di FTY720 sia per la maggior parte mediata dallo stato di attivazione di SHP-1. Infatti, in HSCs in cui è stata silenziata SHP-1(46 B) l'effetto inibitorio di FTY720 è molto ridotto rispetto alle HSCs di controllo dopo stimolazione con PDGF (46 A). L'azione di SHP-1 vede comunque l'intervento di PP2A in quanto l'azione inibitoria di FTY720 è praticamente annullata in presenza di acido okadaico.



**Figura 46: Effetto di FTY720 e di acido okadaico sulla proliferazione indotta da PDGF di HSCs attivate e HSCs attivate siRNA per SHP-1.** Le cellule normali o silenziate (siRNA per SHP-1), attivate in coltura al terzo passaggio sono state seminate, fatte aderire su piastre da 96 pozzetti con l'aiuto di collagene e stimulate dopo essere state per almeno 24 ore senza siero, e in presenza o meno di una pre-incubazione con FTY720 5  $\mu$ M e/o acido Okadaico 200 nM di 30 minuti, come descritto nel capitolo dei metodi. Successivamente sono state stimulate con PDGF 50 ng/ml per i tempi indicati in figura. Allo scadere dell'incubazione, le piastre sono state processate con il Kit-Delfia per la valutazione della proliferazione, come descritto nel capitolo dei metodi

## 6 Discussionione

PDGF è stato dimostrato essere una molecola chiave nel ruolo svolto dalle HSCs durante il processo fibrotico in seguito a danno epatico, agendo come il più potente fattore mitogenico e come fattore chemiotattico attraverso il legame con il suo recettore, PDGFR, membro della famiglia delle tirosine chinasi recettoriali (RTK). Questo evento causa la dimerizzazione del recettore, la successiva attivazione del dominio chinasi di PDFGR e l'autofosforilazione di specifici



residui di tirosina nella sua regione citosolica, e crea una piattaforma di fosfo-tirosine per “ l’attracco” di domini SH2 di diverse proteine, le quali contribuiscono alla propagazione delle vie di segnale a valle. Per questi motivi, l’inibizione delle vie del segnale attivate da questo fattore di crescita che vedono come evento critico l’autofosforilazione del PDGFR sono considerate un’area di interesse sempre più analizzata per la ricerca di potenziali farmaci anti-fibrotici. Il livello della fosforilazione tirosinica di PDGFR non è però determinato solamente dall’attività chinasi del recettore stesso ma anche dall’azione concertata e opposta delle PTPs; di conseguenza, anche le PTPs, responsabili della defosforilazione del recettore, possono rappresentare bersagli di farmaci per stabilire nuove strategie terapeutiche contro la fibrosi. In questa terza parte di tesi è stato dimostrato che SHP-1, una PTP non recettoriale, defosforila PDGFR, esercitando un’azione inibitoria sulla proliferazione cellulare delle HSCs dopo stimolazione con PDGF. L’espressione di questa PTP è descritta in letteratura principalmente nelle cellule di origine ematopoietica, assieme ad un’altra PTP caratterizzata da un alto grado di omologia con SHP-1, SHP-2; in questo lavoro, invece, SHP-1 è stata per la prima volta determinata anche nelle HSCs e la sua attività fosfatasi risulta essere attivata ed è strettamente controllata dalla sua struttura multi-modulare e dalla fosforilazione di specifici residui aminoacidici, tra cui Ser591, con azione inibitoria e Tyr 564, con azione attivatoria. Poiché è stato evidenziato che la diminuzione dello stato di fosforilazione di PDGFR presenta lo stesso andamento dell’attivazione di SHP-1 dopo stimolazione con PDGF di HSCs e che il silenziamento di SHP-1 determina un aumento dello stato di fosforilazione di PDGFR, con aumentata velocità di proliferazione cellulare nelle stesse condizioni di coltura di HSCs, il lavoro è proseguito con l’obiettivo di dimostrare l’efficacia della attivazione di SHP-1 nell’inibire lo stato di fosforilazione di PDGFR e di conseguenza la propagazione delle vie di segnale ed infine la proliferazione cellulare.

FTY720 (Fingolimod) è un derivato sintetico della miriocina metabolita del fungo *Isaria sinclairii* e *Myrothecium verrucaria*, utilizzato nella medicina popolare cinese come elisir di lunga vita, in quanto agisce modulando il sistema immunitario ed infatti, originariamente, era stato proposto come farmaco

antirigetto nei trapianti. In vivo, FTY720 viene rapidamente fosforilato da una sfingosina chinasi-2 ed è così trasformato nel suo metabolita attivo: FTY720-P, analogo strutturale della sfingosina 1 fosfato (S1P), un lisofosfolipide che regola numerose attività fisiologiche come la neurogenesi, lo sviluppo cardiovascolare e la migrazione leucocitaria. Attualmente, grazie all'azione della sua forma fosforilata, è valutato in fase III di trials clinici per la sclerosi multipla anche se è stato dimostrato che nella sua forma non fosforilata FTY720 è un attivatore della Ser/Thr protein fosfatasi PP2A, la quale presenta tra l'elenco dei suoi substrati SHP-1. L'azione di PP2A su SHP-1 è quella di defosforilare la Ser591, rimuovendo l'azione inibitoria esercitata da questo residuo fosforilato sull'attività di SHP-1 (Korporaal S.J. et al., 2008; Chen K.F. et al., 2010).

Inoltre un recente lavoro del nostro gruppo (*Brunati A.M. et al., Biochim. Biophys. Acta, 2008*) dimostra che FTY720 inibisce la proliferazione cellulare di HSCs dopo stimolazione con PDGF, agendo sia come competitore dei recettori della sfingosina 1-fosfato (S1P) che come inibitore del livello di fosforilazione del PDGFR, anche se il meccanismo di questa inibizione non è ancora stato indagato. Il silenziamento di SHP-1 e l'utilizzo di un inibitore specifico, acido okadaico, di PP2A su HSCs stimulate con PDGF ha dimostrato che l'effetto inibitorio di FTY720 sulla proliferazione cellulare è mediato principalmente dalla sua forma non fosforilata e vede attivato l'asse PP2A/SHP-1.

I risultati presentati mettono quindi in evidenza come enzimi, PDGFR e PTPs, coinvolti nel regolare il livello di fosforilazione del PDGFR, rappresentano dei potenziali bersaglio per lo sviluppo di farmaci anti-fibrotici. Sebbene non esistano farmaci approvati come agenti anti-fibrotici, alcune molecole già impiegate nel trattamento di altre malattie hanno esibito attività anti-fibrotica, attraverso l'inibizione, pur non esclusiva, dell'attività del PDGFR, tra cui imatinib e suoi derivati nilotinib e dasatinib. Anche FTY720, attualmente impiegato in fase III di sperimentazione per la sclerosi multipla, si propone come possibile farmaco anti-fibrotico, anche se in questo caso non richiede l'intervento della forma fosforilata e il bersaglio della sua azione è la PP2A, che successivamente attiva SHP-1.

# *Bibliografia*



Adamson J.W., Fialkow, P.J., Murphy S., Prchal J.F., Steinmann L. Polycythemia vera: stemm-cell and probable clonal origin of the disease. 1976 N. Engl. J. Med. 295:913-916.

Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J., Mustelin T., Protein tyrosine phosphatases in the human genome. 2004 Cell. Jun 11;117(6):699-711.

Antczak A.J., Singh N., Gay S.R., Worth R.G., IgG-complex stimulated platelets: a source of sCD40L and RANTES in initiation of inflammatory cascade. 2010 Cell Immunol.;263(1):129-33. Epub 2010 Mar 20.

Arderiu G., Díaz-Ricart M., Buckley B., Escolar G., Ordinas A., Primary arrest of circulating platelets on collagen involves phosphorylation of Syk, cortactin and focal adhesion kinase: studies under flow conditions. 2002 Biochem J. May 15;364(Pt 1):65-71.

Arepally G., McKenzie S.E., Jiang X.M., Poncz M., Cines D.B., Fc gamma RIIA H/R 131 polymorphism, subclass-specific IgG anti-heparin/platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. 1997 Blood. Jan 15;89(2):370-5.

Argetsinger L.S., Kouadio J.L., Steen H., Stensballe A., Jensen O.N., Carter-Su C. Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. 2004 Mol Cell. Biol. 24: 4955-4967.

Asazuma N., Wilde J.I., Berlanga O., Leduc M., Leo A., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Bon C., Liu S.K., McGlade C.J., Schraven B., Watson S.P., Interaction of linker for activation of T cells with multiple adapter proteins in

platelets activated by the glycoprotein VI-selective ligand, convulxin. 2000 J Biol Chem. Oct 27;275(43):33427-34.

Barr A.J., Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development. 2010 Future Med Chem. Oct;2(10):1563-76.

Bartram C.R., De Klein A., Hagemeijer A., Van Agthoven T., Geurts van Kessel A., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M.A., Davies T., Stone M. et al., Translocation of c-Abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. 1983 Nature 306: 277-280.

Battaller R. and Brenner D.A., Liver fibrosis. 2005 J Clin Invest. Feb;115(2):209-18.

Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., Vassiliou G.S., Bench A.J., Boyd E.M., Curtin N., Scott M.A., Erber W.N., Green A.R., Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. 2005 Lancet 365: 1054-1061.

Berchtold S., Moriggl R., Gouilleux F., Silvennoinen O., Beisenherz C., Pfitzner E., Wissler M., Stocklin E., Groner B. Cytokine receptorindependent, constitutively active variants of STAT5. 1997 J. Biol. Chem. 272:30237-30243.

Bjorge J.D., Pang A., Fujita D.J., Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. 2000 J Biol Chem. Dec 29;275(52):41439-46.

Boggon T.J. and Eck M.J., Structure and regulation of Src familykinases 2004 Oncogene. 23: 7918-7927.

Bouaziz A., Amor N.B., Woodard G.E., Zibidi H., López J.J., Bartegi A., Salido G.M., Rosado J.A., Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation balance is involved in thrombin-evoked microtubular reorganisation in human platelets. 2007 *Thromb Haemost.* Aug;98(2):375-84.

Boylan B., Gao C., Rathore V., Gill J.C., Newman D.K., Newman P.J., Identification of FcγRIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets. 2008 *Blood.* Oct 1;112(7):2780-6. Epub 2008 Jul 18.

Briggs S.D., Sharkey M., Stevenson M., Smithgall T.E., SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. 1997 *J. Biol. Chem.* 272: 17899-17902.

Brizzi M.F., Battaglia E., Rosso A. et al., Regulation of polymorphonuclear cell activation by thrombopoietin. 1997 *J Clin Invest.*;99:1576-1584.

Brown M. and Cooper J.A., Regulation, substrates and function of Src. 1996 *Biochim. Biophys. Acta.* 1287: 121-149.

Brugge J.S. and Erikson R.L., Identification of a transformation specific antigen induced by an avian sarcoma virus. 1977 *Nature.* 269: 346-348.

Brunati A.M., Tibaldi E., Carraro A., Gringeri E., D'Amico F. Jr, Toninello A., Massimino M.L., Pagano M.A., Nalesso G., Cillo U., Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FTY720 in activated HSC-cultures. 2008 *Biochim Biophys Acta.* Mar;1783(3):347-59. Epub 2007 Nov 29.

Brunati AM, Deana R, Folda A, Massimino ML, Marin O, Ledro S, Pinna LA, Donella-Deana A., Thrombin-induced tyrosine phosphorylation of HS1 in human platelets is sequentially catalyzed by Syk and Lyn tyrosine kinases and associated with the cellular migration of the protein. 2005 J Biol Chem. Jun 3;280(22):21029-35. Epub 2005 Mar 28.

Caplan A.J., Mandal A.K., Theodoraki M.A., Molecular chaperones and protein kinase quality control. 2007 Trends Cell Biol. 17: 87-92.

Cardier J.E. and Dempsey J., Thrombopoietin and its receptor, c-mpl, are constitutively expressed by mouse liver endothelial cells: evidence of thrombopoietin as a growth factor for liver endothelial cells. 1998 Blood;91:923-929.

Carloni V., Defranco R.M., Caligiuri A., Gentilini A., Sciammetta S.C., Baldi E., Lottini B., Gentilini P., Pinzani M., Cell adhesion regulates platelet-derived growth factor-induced MAP kinase and PI-3 kinase activation in stellate cells. 2002 Hepatology. Sep;36(3):582-91.

Carlsson L.E., Lubenow N., Blumentritt C., Kempf R., Papenberg S., Schröder W., Eichler P., Herrmann F.H., Santoso S., Greinacher A., Platelet receptor and clotting factor polymorphisms as genetic risk factors for thromboembolic complications in heparin-induced thrombocytopenia. 2003 Pharmacogenetics. May;13(5):253-8.

Carlsson L.E., Santoso S., Baurichter G., Kroll H., Papenberg S., Eichler P., Westerdaal N.A., Kiefel V., van de Winkel J.G., Greinacher A., Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the FcγRIIa-R-H131 polymorphism. 1998 Blood. Sep 1;92(5):1526-31.



Chen K.F., Yu H.C., Liu T.H., Lee S.S., Chen P.J., Cheng A.L., Synergistic interactions between sorafenib and bortezomib in hepatocellular carcinoma involve PP2A-dependent Akt inactivation. 2009 J Hepatol. 2010 Jan;52(1):88-95. Epub Oct 23.

Chen M., Cheng A., Candotti F., Zhou Y.J., Hymel A., Fasth A., Notarangelo L.D., O'Shea J.J., Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains. 2000 Mol Cell Biol, 20:947-956.

Chong Y.P., Mulhern T.D., Cheng H.C., C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK) – endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. 2005 Growth Factors. 23: 233-244.

Citri A., Harari D., Shohat G., Ramakrishnan P., Gan J., Lavi S., Eisenstein M., Kimchi A., Wallach D., Pietrokovski S., Yarden Y., Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. 2006 J. Biol. Chem. 281:14361-14369.

Clemetson K.J. and Clemetson J.M., Collagen receptors as potential targets for novel anti-platelet agents. 2007 Curr Pharm Des.;13(26):2673-83.

Correa P.N., Eskinazi D., Axelrad A.A., Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. 1994 Blood 83: 99-112.

Covic L., Gresser A.L., Kuliopulos A., Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. 2000 Biochemistry; 39:5458–5467.

Cowan-Jacob S.W., Structural biology of protein tyrosine kinases. 2006 Cell Mol Life Sci. Nov;63(22):2608-25.

Dai C.H., Krantz S.B., Dessypris E.N., Means R.T. Jr, Horn S.T., Gilbert H.S.. Polycythemia vera, II: hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. 1992 Blood 80: 891-899.

Daniels A.B., Worth R.G., Dickstein R.J., Dickstein J.S., Kim-Han T.H., Kim M.K., Schreiber A.D., Analysis of FcγRIIIA cytoplasmic tail requirements in signaling for serotonin secretion: evidence for an ITAM-dependent, PI3K-dependent pathway. 2010 Scand J Immunol. Apr;71(4):232-9.

Delhommeau F., Pisani D.F., James C., Casadevall N., Constantinescu S., Vainchenker W., Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. 2006 Cell Mol Life Sci. Dec;63(24):2939-53.

Ding J., Komatsu H., Wakita A., Kato-Uranishi M., Ito M., Satoh A., Tsuboi K., Nitta M., Miyazaki H., Iida, S., Ueda R., Familial essential thrombocytemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. 2004 Blood 103: 4198-4200.

El Kasser N., Hetet G., Briere J., Grandchamp B., Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocytemia: Advantages of studying T lymphocytes and platelets. 1997 Blood 89: 128-134.

Fabris F., Luzzatto G., Stefani P.M., Girolami B., Cella G., Girolami A., Heparin-induced thrombocytopenia. 2000 Haematologica. Jan;85(1):72-81.

Falati S., Gross P., Merrill-Skoloff G. et al., Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. 2002 *Nat Med*; 8:1175–1181.

Ferraris A.M., Mangerini R., Racchi O., Rapezzi D., Rolfo M., Casiaro S. et al., Heterogeneity of clonal development in chronic myeloproliferative disorders. 1999 *Am. J. Hematol.* 60: 158-160.

Fontenay-Roupie M., Huret G., Loza J. et al., Thrombopoietin activates human platelets and induces tyrosine phosphorylation of p80/85 cortactin. 1998 *Thromb Haemost.*;79:195-201.

Friedman S. L. in *Diseases of the Liver* (Schiff E., Sorrell M., and Maddrey W., eds) 8th Ed., pp. 371–386, (1998) Lippincott-Raven, Philadelphia.

Friedman S.L., Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. 2004 *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* Dec;1(2):98-105.

Fryer B.H. and Field J., Rho, Rac, Pak and angiogenesis: old roles and newly identified responsibilities in endothelial cells. 2005 *Cancer Lett.* Nov 8;229(1):13-23. Epub 2005 Jan 26.

Geerts A., History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. 2001 *Semin Liver Dis.* Aug;21(3):311-35.

Gonfloni S., Williams J.C., Hattula K., Weijland A., Wierenga R.K., Superti-Furga G., The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src. 1997 *EMBO J.* 16: 7261-7271.

Gratacap M.P., Hérault J.P., Viala C., Ragab A., Savi P., Herbert J.M., Chap H., Plantavid M., Payrastré B., Fcγ<sub>3</sub>RIIA requires a Gi-dependent pathway for an efficient stimulation of phosphoinositide 3-kinase, calcium mobilization, and platelet aggregation. 2000 *Blood*. Nov 15;96(10):3439-46.

Green D., Harris K., Reynolds N., Roberts M., Patterson R., Heparin immune thrombocytopenia: evidence for a heparin-platelet complex as the antigenic determinant. 1978 *J Lab Clin Med*. Jan;91(1):167-75.

Greinacher A., Althaus K., Krauel K., Selleng S., Heparin-induced thrombocytopenia. 2010 *Hamostaseologie*. Jan;30(1):17-8, 20-8.

Gross B.S., Lee J.R., Clements J.L. et al., Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets. 1999 *J Biol Chem*; 274:5963–5971.

Gruel Y., Pouplard C., Lasne D., Magdelaine-Beuzelin C., Charroing C., Watier H., The homozygous Fcγ<sub>3</sub>RIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes. 2004 *Blood*. Nov 1;104(9):2791-3. Epub 2004 Jun 10.

Guyot C., Lepreux S., Combe C., Doudnikoff E., Bioulac-Sage P., Balabaud C., Desmoulière A., Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. 2006 *Int J Biochem Cell Biol*. Feb;38(2):135-51. Epub 2005 Sep 23.

Hamm H.E., How activated receptors couple to G proteins. 2001 *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98:4819–4821.

Hanks S.K. and Hunter T., Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. 1995 FASEB J. May;9(8):576-96.

Harrison C.N., Platelets and Thrombosis in Myeloproliferative Diseases. 2005 Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 409-415.

Hofmann S.R., Lam A.Q., Frank S., Zhou Y.J., Ramos H.L., Kanno Y., Agnello D., Youle R.J., O'Shea J.J., Jak3-independent trafficking of the common gamma chain receptor subunit: chaperone function of Jaks revisited. 2004 Mol Cell Biol, 24:5039-5049-

Huang L.J., Constantinescu S.N., Lodish H.F., The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. 2001 Mol Cell, 8:1327-1338.

Huang M.M., Indik Z., Brass L.F., Hoxie J.A., Schreiber A.D., Brugge J.S., Activation of Fc gamma RII induces tyrosine phosphorylation of multiple proteins including Fc gamma RII. 1992 J Biol Chem. Mar 15;267(8):5467-73.

Hubbard S.R. and Till J.H., Protein tyrosine kinase structure and function. 2000 Annu Rev Biochem.;69:373-98.

Hulett M.D. and Hogarth P.M., Molecular basis of Fc receptor function. 1994 Adv Immunol.;57:1-127.

Hunter T., Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. 2009 Curr Opin Cell Biol. Apr;21(2):140-6. Epub 2009 Mar 9.

Huntington N.D., Tarlinton D.M., CD45: direct and indirect government of immune regulation. 2004 *Immunol Lett.* Jul 15;94(3):167-74.

Huntly B.J., Shigematsu H., Deguchi K., Lee B.H., Mizuno S., Duclos N., Rowan R., Amaral S., Curley D., Williams I.R., Akashi K., Gilliland D.G., MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. 2004 *Cancer Cell* 6: 587-596.

Ihle J.N., Cytokine receptor signalling. 1995 *Nature* 377: 591-594

James C., Ugo V., Le Couedic J.P., Staerk J., Delhommeau F., Lacout C., Garcon L., Raslova H., Berger R., Bennaceur-Griscelli A., Villeval J.L., Constantinescu S.N., Casadevall N., Vainchenker W., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. 2005 *Nature* 434: 1144-1148.

Jamieson C.H., Gotlib J., Durocher J.A., Chao M.P., Mariappan M.R., Lay M., Jones C., Zehnder J.L., Lilleberg S.L., Weissman I.L., The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 6224-6229.

Jantzen H.M., Milstone D.S., Gousset L. et al., Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2) 2001 *J Clin Invest*; 108:477-483.

Jin J. and Kunapuli S.P., Coactivation of two different G proteincoupled receptors is essential for ADP induced platelet aggregation. 1998 *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:8070-8074.

Johnson L.N. and Lewis R.J., Structural basis for control by phosphorylation. 2001 *Chem Rev.* Aug;101(8):2209-42.

Kahn M.L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M.J., Ishihara H., Coughlin S.R.J., Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. 1999 *Clin Invest.* Mar;103(6):879-87.

Kamal, A. Thao, L. Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.C., Burrows F.J., A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. 2003 *Nature.* 425: 407-410.

Karassa F.B., Trikalinos T.A., Ioannidis J.P., The role of FcγRIIA and IIIA polymorphisms in autoimmune diseases. 2004 *Biomed Pharmacother.* Jun;58(5):286-91.

Kato K., Fridman W.H., Arata Y., Sautès-Fridman C., A conformational change in the Fc precludes the binding of two Fcγ receptor molecules to one IgG. 2000 *Immunol Today.* Jul;21(7):310-2.

Kaushansky K., Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. 1995 *Blood.*;86:419-431.

Kawamura M., McVicar D.W., Johnston J.A., Blake T.B., Chen Y.Q., Lal B.K., Lloyd A.R., Kelvin D.J., Staples J.E., Ortaldo J.R., et al., Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. 1994 *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6374-6378.

Kaywin P., McDonough M., Insel P.A., Shattil S.J., Platelet function in essential thrombocythemia. 1978. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors. *N. Engl. J. Med.* 299: 505-509.

Kelton J.G., The pathophysiology of heparin-induced thrombocytopenia: biological basis for treatment. 2005 *Chest.* Feb;127(2 Suppl):9S-20S.

Kessler C.M., Propensity for hemorrhage and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders. 2004 *Sem. Hematol.* 41: 10-14.

Klages B., Brandt U., Simon M.I. et al., Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. 1999 *J Cell Biol*;144:745–754.

Kmieciak T.E., Shalloway D., Activation and suppression of pp60csrc transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. 1987 *Cell* 49: 65-73.

Knittel T., Kobold D., Saile B., Grundmann A., Neubauer K., Piscaglia F., Ramadori G., 1999 *Gastroenterology* 117, 1205–1221.

Korporaal S.J., Koekman C.A., Verhoef S., van der Wal D.E., Bezemer M., Van Eck M., Akkerman J.W., Downregulation of platelet responsiveness upon contact with LDL by the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. 2009 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Mar;29(3):372-9. Epub 2008 Dec 18.

Kralovics R., Guan Y., Prchal J.T., Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. 2002 *Exp. Hematol.* 30: 229-236.

Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R., Passweg J.R., Tichelli A., Cazzola M., Skoda R.C., A gain of function mutation of Jak2 in patients with myeloproliferative disorders. 2005 *N. Engl. J. Med.* 352: 1779-1790.

Krizhanovsky V., Yon M., Dickins R.A., Hearn S., Simon J., Miething C., Yee H., Zender L., Lowe S.W., Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. 2008 *Cell.* Aug 22;134(4):657-67.



Lages B. and Weiss H.J., Secreted dense granule adenine nucleotides promote calcium influx and the maintenance of elevated cytosolic calcium levels in stimulated human platelets. 1999 *Thromb. Haemost.* 81: 286-292.

Lerner E.C., Smithgall T.E., SH3-dependent stimulation of Src family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. 2002 *Nat. Struct. Biol.* 9: 365-369.

Lerner E.C., Tribble R.P., Schiavone A.P., Hochrein J.M., Engen J.R., Smithgall T.E., 2005 Activation of the Src family kinase Hck without SH3-linker release. *J. Biol. Chem.* 280: 40832-40837.

Levin V.A., Basis and importance of Src as a target in cancer. 2004 *Cancer Treat Res.*;119:89-119.

Levine R.L., Belisle C., Wadleigh M., Zahrieh D., Lee S., Chagnon P., Gilliland D.G., Busque, L., X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. 2006 *Blood* 107: 4039-4041.

Levine R.L., Loriaux M., Huntly B.J., Loh M.L., Beran M., Stoffregen E., Berger R., Clark J.J., Willis S.G., Nguyen K.T., Flores N.J., Estey E., Gattermann N., Armstrong S., Look A.T., Griffin J.D., Bernard O.A., Heinrich M.C., Gilliland D.G., Druker B., Deininger M.W., The JAK2V617F activating mutation occur in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. 2005 *Blood* 106: 3377-3379.

Levine R.L., Pardanani A., Tefferi A., Gilliland D.G.. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. 2007 *Nature* 7: 673-683.

Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J., Boggon T.J., Wlodarska I., Clark J.J., Moore S., Adelsperger J., Koo S., Lee J.C., Gabriel S., Mercher T., D'Andrea A., Frohling S., Dohner K., Marynen P., Vandenberghe P., Mesa R.A., Tefferi A., Griffin J.D., Eck M.J., Sellers W.R., Meyerson M., Golub T.R., Lee S.J., Gilliland D.G., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. 2005 *Cancer Cell* 7: 387-397.

Li D. and Friedman S.L., Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. 1999 *J Gastroenterol Hepatol.* Jul;14(7):618-33.

Lim W.A. and Pawson T., Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. 2010 *Cell.* Sep 3;142(5):661-7.

Lorenz U., SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. 2009 *Immunol Rev.* Mar;228(1):342-59. Review.

Lu X., Levine R., Tong W., Wernig G., Pikman Y., Zarnegar S., Gilliland D.G. Lodish, H., Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. 2005 *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 102: 18962-18967.

Luo H., Rose P., Barber D., Hanratty W.P., Lee S., Roberts T.M., D'Andrea A.D., Dearolf C.R. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. 1997 *Mol. Cell. Biol.* 17: 1562-1571.

Manning G., White D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome 2002 *Science*. 298: 1912-1934.

Michielis J.J., Berneman Z., Schroyens W., Finazzi G., Buddle U., van Vliet H.. The paradox of platelets activation and impaired function: platelets –von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocytemia and polycytemia vera. 2006 *Semin. Thromb. Hemost.* 32:589-604.

Mitaka T., Sato F., Mizuguchi T., Yokono T., Mochizuki Y., Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. 1999 *Hepatology*. Jan;29(1):111-25.

Mittelman M., Gardyn J., Carmel M., Malovani H., Barak Y., Nir U., Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. 1996 *Leuk. Res.* 20: 459-466.

Moarefi I., LaFevre-Bernt M., Sicheri F., Huse M., Lee C.H., Kuriyan J., Miller W.T., Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. 1997 *Nature* 385: 650-3.

Moliterno A.R., Hankins W.D., Spivak J.L., Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. 1998 *N. Engl. J. Med.* 338: 572-580.

Musso T., Johnston J.A., Linnekin D., Varesio L., Rowe T.K., O'Shea J.J., McVicar D.W., Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7. 1995 *J Exp Med*, 181:1425-1431.

Neel B.G. and Tonks N.K., Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. 1997 *Curr Opin Cell Biol.* Apr;9(2):193-204.

Nezlin R., Circulating non-immune IgG complexes in health and disease. 2009 *Immunol Lett.* Feb 21;122(2):141-4. Epub 2009 Feb 2.

Nezlin R., Interactions between immunoglobulin G molecules. 2010 *Immunol Lett.* Aug 16;132(1-2):1-5. Epub 2010 Jun 18.

Nimmerjahn F. and Ravetch J.V., Fcγ receptors as regulators of immune responses. 2008 *Nat Rev Immunol.* Jan;8(1):34-47.

Nowell P.C., Hungerford D.A., Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. 1960 *J. Natl. Cancer Inst.* 25: 85-109.

Oda A., Miyakawa Y., Druker B.J. et al., Thrombopoietin primes human platelet aggregation induced by shear stress and by multiple agonists. 1996 *Blood.*;87:4664-4670.

Offermanns S. and Simon M.I., Genetic analysis of mammalian G-protein signalling. 1998 *Oncogene*; 17:1375–1381.

Offermanns S., Laugwitz K.L., Spicher K. et al., G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. 1994 *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91:504–508.

Offermanns S., Toombs C.F., Hu Y.H. et al., Defective platelet activation in Gα(q)-deficient mice. 1997 *Nature*; 389:183–186.

Pawson T., Gish G.D., Nash P., SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. 2001 Trends Cell Biol. Dec;11(12):504-11.

Phillips D.R., Nannizzi-Alaimo L., Prasad K.S., Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GPIIb-IIIa) outside-in integrin signaling. 2001 Thromb Haemost; 86:246-258.

Pikman Y., Lee B.H., Mercher T., McDowell E., Ebert B.L., Gozo M., Cuker A., Wernig G., Moore S., Galinsky I., DeAngelo D.J., Clark J.J., Lee S.J., Golub T.R., Wadleigh M., Gilliland D.G., Levine R.L., MPLW515L is a novel activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. 2006 Plos Med. 3: 270.

Pinna L.A. and Ruzzene M., How do protein kinase recognize their substrates? Biochim Biophys Acta. 1996 Dec 12;1314(3):191-225.

Poole A.W., Jones M.L., A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. 2005 Cell Signal. Nov;17(11):1323-32.

Porter M., Schindler T., Kuriyan J., Miller, W.T., Reciprocal regulation of Hck activity by phosphorylation of Tyr(527) and Tyr(416). Effect of introducing a high affinity intramolecular SH2 ligand. 2000 J. Biol. Chem. 275: 2721-2726.

Prchal J.F., Axelrad A.A., Letter: bone-marrow responses in polycythemia vera. 1974 N. Engl. J. Med. 290: 1382.

Ragab A., Bodin S., Viala C., Chap H., Payrastre B., Ragab-Thomas J., The tyrosine phosphatase 1B regulates linker for activation of T-cell phosphorylation and platelet aggregation upon Fc gamma RIIa cross-linking. 2003 J Biol Chem. Oct 17;278(42):40923-32. Epub 2003 Jul 12.

Ragimbeau J., Dondi E., Alcover A., Eid P., Uze G., Pellegrini S., The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. 2003 EMBO J, 22:537-547.

Rascu A., Repp R., Westerdaal N.A., Kalden J.R., van de Winkel J.G., Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms. 1997 Ann N Y Acad Sci. Apr 5;815:282-95.

Ravetch J.V. and Bolland S., IgG Fc receptors. 2001 Annu Rev Immunol.;19:275-90.

Reilly M.P., Taylor S.M., Hartman N.K., Arepally G.M., Sachais B.S., Cines D.B., Poncz M., McKenzie S.E., Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA. 2001 Blood. Oct 15;98(8):2442-7.

Rhodes G.R., Dixon R.H., Silver D., Heparin induced thrombocytopenia with thrombotic and hemorrhagic manifestations. 1973 Surg Gynecol Obstet. Mar;136(3):409-16.

Rivera J., Lozano M.L., Navarro-Núñez L., Vicente V., Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. 2009 Haematologica. May;94(5):700-11. Epub 2009 Mar 13.

Roskoski R., Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. 2005 Biochem. Biophys. Res. Comm. 331: 1-14.

Roskoski R.J., Src protein tyrosine kinase structure and regulation. 2004 Biochem. Biophys. Res. Comm. 324: 1155-1164.

Rous P.A., A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumour cells. 1911 J. Exp. Med. 13: 397-411.

Rovida E., Navari N., Caligiuri A., Dello Sbarba P., Marra F.J., ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells. 2008 Hepatol. Jan;48(1):107-15. Epub 2007 Oct 17.

Saharinen P., Takaluoma K., Silvennoinen O., Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. 2000 Mol Cell Biol, 20:3387-3395.

Saharinen P., Vihinen M., Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. 2003 Mol. Biol. Cell. 14: 1448-1459.

Salmon J.E. and Pricop L., Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. 2001 Arthritis Rheum. Apr;44(4):739-50.

Sanders L.A., Feldman R.G., Voorhorst-Ogink M.M., de Haas M., Rijkers G.T., Capel P.J., Zegers B.J., van de Winkel J.G., Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. 1995 Infect Immun. Jan;63(1):73-81.

Sasaki K., Odai H., Hanazono Y. et al., TPO/c-mpl ligand induces tyrosine phosphorylation of multiple cellular proteins including proto-oncogene products, Vav and c-Cbl, and Ras signaling molecules. 1995 Biochem Biophys Res Commun.;216:338-347.

Scholz G.M., Hartson S.D., Cartledge K., Volk L., Matts R.L., Dunn A.R. The molecular chaperone Hsp90 is required for signal transduction by wild-type Hck

and maintenance of its constitutively active counterpart. 2001 *Cell. Growth Differ.* 12:409-17.

Scott L.M., Scott M.A., Campbell P.J., Green A.R. Progenitors homozygous for the V617F JAK2 mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. 2006 *Blood* 108: 2435- 2437.

Scott L.M., Tong W., Levine R.L., Scott M.A., Beer P.A., Stratton M.R., Futreal P.A., Erber W.N., McMullin M.F., Harrison C.N., Warren A.J., Gilliland D.G., Lodish H.F., Green A.R., JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. 2007 *N. Engl. J. Med.* 356: 459-468.

Semple J.W. and Freedman J., Platelets and innate immunity. 2010 *Cell Mol Life Sci.* Feb;67(4):499-511. Epub 2009 Dec 18.

Shapiro M.J., Weiss E.J., Faruqi T.R. et al., Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. 2000 *J Biol Chem*; 275:25216–25221.

Shi Y., Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. 2009 *Cell.* Oct 30;139(3):468-84.

Sicheri F., Moarefi I., Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. 1997 *Nature.* 385: 602-9.

Sigal C.T., Zhou W., Buser C.A., McLaughlin S., Resh M.D., Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. 1994 *Proc Natl Acad Sci USA.* Dec 6;91(25):12253-7.



Somani A.K., Bignon J.S., Mills G.B., Siminovitch K.A., Branch D.R., Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. 1997 J Biol Chem. Aug 22;272(34):21113-9.

Soulsby M. and Bennett A.M., Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases. 2009 Physiology (Bethesda). Oct;24:281-9.

Spivak J.L., The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. 2004 Semin. Hematol. 41: 1-5.

Stehelin D., Varmus H.E., Bishop J.M., Vogt P.K., DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. 1976 Nature. 260: 170-173.

Sullam P.M., Hyun W.C., Szöllösi J., Dong J., Foss W.M., López J.A., Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor FcγRIIA on the platelet plasma membrane. 1998 J Biol Chem. Feb 27;273(9):5331-6.

Tibaldi E, Brunati AM, Massimino ML, Stringaro A, Colone M, Agostinelli E, Arancia G, Toninello A., Src-Tyrosine kinases are major agents in mitochondrial tyrosine phosphorylation. 2008 J Cell Biochem. Jun 1;104(3):840-9.

Tonks NK, Neel BG., Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. 2001 Curr Opin Cell Biol. Apr;13(2):182-95.

Tortolani P.J., Lal B.K., Riva A., Johnston J.A., Chen Y.Q., Reaman G.H., Beckwith M., Longo D., Ortaldo J.R., Bhatia K., McGrath I., Kehrl J., Tuscano J., McVicar D.W., O'Shea J.J., Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies. 1995 J Immunol, 155:5220-5226.

Tsuji M., Ezumi Y., Arai M., Takayama H., A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. 1997 J Biol Chem. Sep 19;272(38):23528-31.

Tsukada S., Parsons C.J., Rippe R.A., Mechanisms of liver fibrosis. 2006 Clin Chim Acta. Feb;364(1-2):33-60. Epub Sep 1.

Tsukada S., Westwick J.K., Ikejima K., Sato N., Rippe R.A., SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. 2005 J Biol Chem. Mar 18;280(11):10055-64. Epub 2005 Jan 12.

Ushikubi F., Ishibashi T., Narumiya S., Okuma M.,. Analysis of the defective signal transduction mechanism through the platelet thromboxane A2 receptor in a patient with polycythemia vera. 1992 Thromb. Haemost. 67: 144-146.

Van de Winkel J.G. and Capel P.J., Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. 1993 Immunol Today. May;14(5):215-21.

Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D., The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. 2002 Blood 100: 2292-2302.

Velazquez L., Fellous M., Stark G.R., Pellegrini S., A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. 1992 Cell, 70:313-322.

Wallis D.E., Workman D.L., Lewis B.E., Steen L., Pifarre R., Moran J.F., Failure of early heparin cessation as treatment for heparin-induced thrombocytopenia. 1999 Am J Med. Jun;106(6):629-35.

Wang D., Esselman W.J., Cole P.A., Substrate conformational restriction and CD45-catalyzed dephosphorylation of tail tyrosine-phosphorylated Src protein. 2002 J Biol Chem. Oct 25;277(43):40428-33. Epub 2002 Aug 13.

Warkentin T.E. and Kelton J.G., A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. 1996 Am J Med. Nov;101(5):502-7.

Warkentin T.E., Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. 2003 Br J Haematol. May;121(4):535-55.

Watson S.P., Auger J.M., McCarty O.J., Pearce A.C., GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. 2005 J Thromb Haemost. Aug;3(8):1752-62.

Weyrich A.S. and Zimmerman G.A., Platelets: signaling cells in the immune continuum. 2004 Trends Immunol. 25: 489-495.

Wormald S., Hilton D.J. Inhibitors of cytokine signal transduction. 2004 J. Biol. Chem. 279: 821-824.

Worth R.G., Chien C.D., Chien P., Reilly M.P., McKenzie S.E., Schreiber A.D., Platelet Fc gamma RIIA binds and internalizes IgG-containing complexes. 2006 Exp Hematol. Nov;34(11):1490-5.

Woulfe D., Jiang H., Mortensen R. et al., Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. 2002 J Biol Chem;277:23382–23390.

Woulfe D., Yang J., Prevost N. et al., Signal transduction during the initiation, extension and perpetuation of platelet plug formation. In: Michelson AD, ed. Platelets. New York, NY:Academic Press; 2002; 197–214.

Woulfe D., Yang J., Prevost N., O'Brien P., Fortna R., Tognolini M., Jiang H., Wu J., Brass L.F., Signaling receptors on platelets and megakaryocytes. 2004 *Methods Mol Biol.*;273:3-32.

Xu W., Harrison S.C., Eck M.J., Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. 1997 *Nature*. 385: 595-602.

Xu Y., Lindquist S., Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7074-7078.

Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt V.E. 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ., The Janus kinases (Jaks). 2004 *Genome Biol.*;5(12):253. Epub 2004 Nov 30.

Yang J., Wu J., Jiang H. et al., Signaling through Gi family members in platelets: redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. 2002 *J Biol Chem*; 277:46035–46042.

Yang J., Wu J., Kowalska M.A. et al., Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. 2000 *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97:9984–9989.

Young M.A., Gonfloni S., Superfi-Furga G., Roux B., Kuriyan J., Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. 2001 *Cell*. 105: 115-126.

Zhang S.Q., Yang W., Kontaridis M.I., Bivona T.G., Wen G., Araki T., Luo J., Thompson J.A., Schraven B.L., Philips M.R., Neel B.G., Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. 2004 *Mol Cell*. Feb 13;13(3):341-55.

Zhao R., Xing S., Li Z., Fu X., Li Q., Krantz S.B., Zhao Z.J., Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. 2005.J. Biol. Chem. 280: 22788-22792.

Zhou Y.J., Chen M., Cusack N.A., Kimmel L.H., Magnuson K.S., Boyd J.G., Lin W., Roberts J.L., Lengi A., Buckley R.H., Geahlen R.L., Candotti F., Gadina M., Changelian P.S., O'Shea J.J., Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. 2001 Mol Cell, 8:959- 969.