

INDICE

	Pag.
INTRODUZIONE	1
La leucemia promielocitica acuta	3
– Trattamento dei pazienti con APL	7
• Trattamento differenziante con ATRA	8
• Trattamento con Triossido d’Arsenico	11
• Terapie alternative al trattamento differenziante	12
– Fattori prognostici nella terapia dell’APL	12
– Molecole del signalling intracellulare coinvolte nel meccanismo di differenziamento granulocitario indotto da ATRA	14
La famiglia proteica Vav	16
– Struttura modulare delle proteine Vav	17
– Funzioni della proteina Vav1	18
• Attività enzimatica come scambiatore guanosinico	18
• Vav1 come proteina adattatrice	20
• Ruolo di Vav1 nel compartimento nucleare	20
– Ruolo della fosforilazione tirosinica di Vav1	22
– Ruolo di Vav1 nelle cellule ematopoietiche normali	24
• Ruolo di Vav1 nelle cellule linfoidei	25
• Ruolo di Vav1 nelle cellule mieloidi mature	26
* Ruolo di Vav1 nei monociti/macrofagi	26
* Ruolo di Vav1 nelle piastrine	27
* Ruolo di Vav1 nei granulociti neutrofili	27
– Ruolo di Vav1 in tessuti non ematopoietici	28
– Ruolo di Vav1 nel differenziamento di precursori mieloidi tumorali	30
• Vav1 promuove la maturazione a granulociti neutrofili di cellule APL-derivate	31
• Vav1 regola il citoscheletro/nucleoscheletro actinico nel corso del trattamento con ATRA di cellule HL-60	33

OBIETTIVO	37
MATERIALI E METODI	38
– Modello sperimentale	38
– Down-modulazione dell'espressione di Vav1 mediante la tecnica del siRNA	39
– Elettroforesi bidimensionale	40
• Preparazione del campione	40
• Isoelettrofocalizzazione	40
• Separazione elettroforetica ed analisi delle mappe proteiche	41
– Spettrometria di massa per l'identificazione delle proteine dopo elettroforesi bidimensionale	42
– Separazione di proteine in funzione del loro pH	42
– Immunoprecipitazione di Vav1	43
– Spettrometria di massa per l'identificazione delle tirosine fosforilate di Vav1	44
– Mutagenesi sito-specifica	44
– Over-espressione delle forme mutate in tirosina della proteina Vav1	45
– Saggio di migrazione cellulare	46
– Analisi immunochimica	46
– Analisi statistiche	48
RISULTATI E DISCUSSIONE	49
– Vav1 modula l'espressione proteica durante il differenziamento ATRA-indotto dei promielociti tumorali APL-derivati	49
– La tirosina 745 di Vav1 è fosforilata durante il differenziamento ATRA-indotto di cellule NB4	60
– Tirosine presenti nel dominio SH2 di Vav1 sono potenzialmente fosforilabili dalla tirosina chinasi Syk	70
CONCLUSIONI	76
RINGRAZIAMENTI	79
BIBLIOGRAFIA	80
APPENDICE	92

INTRODUZIONE

La leucemia è un tumore maligno causato dalla proliferazione incontrollata di alcuni precursori di cellule del sangue. Tale patologia è la conseguenza di gravi alterazioni dei meccanismi che regolano i processi di produzione e di maturazione delle cellule emopoietiche, che frequentemente rimangono in uno stato più o meno immaturo, senza raggiungere né la morfologia né la funzione delle cellule normali.

Le leucemie possono essere suddivise in due grandi gruppi in relazione al tipo di cellule interessate alla trasformazione tumorale: leucemie mieloidi, che colpiscono globuli rossi, leucociti e piastrine e leucemie linfoidei, che coinvolgono cellule localizzate nei linfonodi e nella milza (linfociti e plasmacellule).

Dal punto di vista clinico, si possono distinguere forme acute, caratterizzate da un decorso rapido, che coinvolgono principalmente cellule solo minimamente differenziate e che per tale motivo non possono assolvere alle loro normali funzioni, e forme croniche ad evoluzione lenta dove si ha la proliferazione di cellule ad uno stadio maturativo superiore, in grado così di assolvere in parte alle loro normali funzioni (Castoldi et al., 2001).

La proliferazione rapida ed invasiva delle cellule tumorali nel midollo osseo fa sì che non vengano più prodotti in numero sufficiente globuli rossi, piastrine e globuli bianchi, con effetti clinici quali anemia, emorragie ed aumentata suscettibilità alle infezioni. Poiché le cellule leucemiche circolano attraverso il sangue ed il sistema linfatico, esse possono infiltrare organi essenziali per la sopravvivenza come polmoni, reni e fegato, il cui funzionamento viene compromesso (Castoldi et al., 2001).

In diverse patologie ematologiche, tra cui alcuni tipi di leucemie acute e linfomi, il mancato differenziamento cellulare, che deriva generalmente da alterazioni geniche che facilitano e/o inducono la proliferazione cellulare. Finora sono state rinvenute anomalie cromosomiche nel 60-65% delle leucemie acute, per lo più rappresentate da traslocazioni e, più raramente, da inversioni cromosomiche, che nella maggior parte dei casi coinvolgono geni che codificano per fattori di trascrizione. Ciò che ne consegue è la formazione di proteine di fusione che svolgono un ruolo chiave nel determinare lo sviluppo della malattia ed esplicano una azione di inibizione del differenziamento cellulare. Altre anomalie geniche, quali mutazioni di geni per recettori di fattori di

crescita e per i cosiddetti “tumor suppressors”, conferiscono un vantaggio proliferativo alle cellule leucemiche (Castoldi et al., 2001).

In numerose patologie ematologiche il fenotipo tumorale può essere abrogato in seguito all'utilizzo di agenti terapeutici, quali biomodulatori (fattori di crescita, TGF β , vitamina D, interferoni, retinoidi), nucleotidi ciclici e sostanze chimiche (DMSO, TPA). Tali agonisti possono indurre le cellule leucemiche a morte programmata (apoptosi), e/o promuoverne il differenziamento, mantenendo la cellula vitale e spingendola verso una completa maturità morfologica e funzionale. In quest'ultimo caso, mediante uno specifico stimolo vengono riattivati o spenti meccanismi regolatori in grado di permettere la fuoriuscita delle cellule dal pool proliferativo e di ripristinarne il normale processo differenziativo. La leucemia mieloide acuta (AML) è il tipo più frequente (incidenza del 30%) e più aggressivo di leucemia. Nel 2003 sono stati diagnosticati negli USA all'incirca 10.500 nuovi casi di AML, corrispondenti a circa 2,7 casi su 100.000 individui.

In Italia, l'ultimo rapporto del Registro Tumori, risalente al 2006, riporta come nel periodo 1998-2002 la AML sia risultata la seconda leucemia in termini di frequenza dopo la leucemia linfatica cronica (26,4% del totale). Nello stesso periodo sono stati diagnosticati in media ogni anno 4,4 casi di AML ogni 100.000 uomini e 3,4 ogni 100.000 donne. Per quanto riguarda la mortalità, nel 2002 in Italia si sono verificati 1.383 decessi per leucemie mieloidi (acute e croniche) fra i maschi e 1.203 decessi fra le femmine (Associazione Italiana Registri Tumori, AIRT, 2006).

L'ultimo rapporto AIRT per i tumori infantili, risalente al 2008, riporta che il tasso di incidenza di AML standardizzato per età sulla popolazione italiana è di 8,4 casi per milione di bambini. Il rischio cumulativo fino a 14 anni di età di sviluppare una AML è 0,13 per mille e l'incidenza è simile nei due sessi, essendo per i maschi di 8,9 e per le femmine di 8,1 casi per milione/anno. L'incidenza di AML non presenta differenze significative tra le diverse classi di età infantile, ma presenta differenze tra le aree geografiche: è più elevata nel Nord (tasso di incidenza 9,2 casi per milione/anno) e minima al Centro (tasso di incidenza 6,4 casi per milione/anno). I registri del Sud presentano un tasso intermedio (tasso di incidenza 8,3 casi per milione/anno).

La prognosi dei bambini affetti da AML ha mostrato nel corso dello studio un miglioramento statisticamente significativo. Per i casi diagnosticati nel 1998-2002, la sopravvivenza cumulativa a 5 anni è stata, infatti complessivamente del 68,2%, mentre per i casi diagnosticati nel primo periodo in studio (1993-97) era stata 39,7% (Associazione Italiana Registri Tumori, AIRT, 2008).

L'incidenza della AML aumenta con l'età e dopo i 55-60 anni cresce esponenzialmente, parallelamente al fatto che la patologia modifica le sue caratteristiche, diventando meno responsiva ai trattamenti (Douer, 2003).

Le leucemie mieloidi acute costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate dall'espansione di blasti bloccati a vari stadi di maturazione lungo le diverse filiere mieloidi. In base al livello di differenziamento cellulare raggiunto, il gruppo Franco-Americano-Britannico (FAB) ha classificato queste leucemie in 8 gruppi:

M0: leucemia mieloblastica acuta indifferenziata (incidenza del 3%);

M1: leucemia mieloblastica acuta con differenziazione minima (incidenza del 15-20%);

M2: leucemia mieloblastica acuta con differenziazione (incidenza del 25-30%);

M3: leucemia promielocitica acuta (incidenza del 5-20%);

M4: leucemia mielomonocitica acuta (incidenza del 20%);

M5: leucemia monocitica acuta (incidenza del 10-20%);

M6: eritroleucemia acuta (incidenza del 5%);

M7: leucemia megacarioblastica acuta (incidenza del 3-12%).

La leucemia promielocitica acuta

La leucemia promielocitica acuta (APL) è uno dei sottotipi di AML più caratteristici dal punto di vista morfologico, clinico e citogenetico. Si tratta di una patologia a rapida progressione, caratterizzata dall'abnorme accumulo nel sangue di cellule della serie bianca bloccate allo stadio maturativo di promielociti.

I blasti APL si presentano morfologicamente come promielociti anomali caratterizzati a livello morfologico da nuclei reniformi o bilobati, con un citoplasma ricco di voluminosi granuli azzurrofilari disposti in file lineari (Auer rods) (Liso et al., 2003). Le proteasi contenute nei granuli sono in grado di causare una diffusa coagulopatia intravascolare e un'abbondante fibrinolisi, alcuni dei sintomi con cui si manifesta l'insorgenza della malattia, nonché causa più frequente di morte. L'APL è infatti caratterizzata da ipofibrinogenemia, variabile deplezione dei fattori di coagulazione, elevati livelli di prodotti di degradazione della fibrina e da un accelerato consumo di piastrine (Cassinat et al., 2001).

Oltre che per l'aspetto citogenetico, morfologico e clinico, le cellule leucemiche APL-derivate sono facilmente riconoscibili da un punto di vista fenotipico in quanto

presentano sulla loro superficie un corredo di antigeni che le caratterizza e che rappresenta, quindi, un rapido e sicuro metodo per la diagnosi della patologia. Come i normali promielociti, i blasti leucemici esprimono una grande quantità di CD117, ma sono caratterizzati da una scarsa o assente espressione di HLA-DR e delle subunità integriniche CD11a e CD18. Presentano inoltre altre caratteristiche tipiche di cellule dotate di capacità adesiva, tra cui una bassa espressione di CD65, una diversa reattività verso gli anticorpi diretti contro l'antigene CD15 e la sua forma sialilata e una debole espressione dell'antigene CD38 (Paietta, 2003).

I dati epidemiologici mostrano differenze tra l'APL e gli altri sottotipi di AML per quanto riguarda la loro correlazione con l'età. Infatti, mentre la frequenza delle leucemie mieloidi acute aumenta proporzionalmente fino a 55 anni dopodichè aumenta esponenzialmente, l'incidenza dell'APL è molto bassa nei bambini di età inferiore ai 10 anni, aumenta durante gli anni dell'adolescenza, arriva a "plateau" nell'età adulta e rimane costante fino a quando non decresce dopo i 60 anni. Sebbene la maggior parte dei casi di APL è diagnosticata tra i 20 e i 50 anni, le caratteristiche genetiche tipiche dell'APL sono state documentate già nei neonati, suggerendo che le aberrazioni cromosomiche responsabili della neoplasia possono instaurarsi già durante lo sviluppo ematopoietico in utero (Ribeiro et al., 2006).

Stando ai dati forniti da diversi trials clinici applicati in America ed in Europa, il 5-13% degli individui con leucemia mieloide acuta sono affetti da APL.

La più alta incidenza di APL si riscontra nei paesi dell'America Latina, dove tale patologia rappresenta il 30% delle leucemie acute non linfoblastiche. Tale fenomeno non ha una spiegazione chiara e può essere imputabile ad una predisposizione genetica così come a fattori ambientali. Alternativamente, si ritiene che l'APL in soggetti latino-americani sia una forma distinta da quella presente nelle altre popolazioni, come dimostra la presenza di riarrangiamenti cromosomici diversi che coinvolgono il gene che codifica per la proteina PML, coinvolta nell'insorgenza dell'APL (Ribeiro et al., 2006). Nel sud dell'Europa (Italia, Spagna, Portogallo) si riscontra un'incidenza maggiore (15-20%) rispetto all'Europa centrale (7% in Germania), con una incidenza media di 2-3 nuovi casi per milione di abitanti ogni anno (Degos et al., 2001).

In Italia si diagnosticano 100 nuovi casi all'anno con una incidenza di circa 0,6 casi per un milione di individui, considerando pazienti oltre i 15 anni di età (Douer, 2003).

Mentre l'incidenza delle AML è in generale maggiore nel sesso maschile, l'APL presenta la tendenza ad una maggior frequenza nelle donne. Si è ipotizzato che tale

fenomeno dipenda dal fatto che gli estrogeni ed i recettori per i retinoidi appartengono alla stessa superfamiglia ed entrambi possono formare eterodimeri con il recettore nucleare RXR. E' stato ipotizzato che nell'APL, il recettore aberrante PML/RAR α possa legarsi a RXR, diminuendone così la disponibilità, e che nel determinare tale associazione possano essere coinvolti gli estrogeni.

Sono stati registrati anche casi di APL durante la gravidanza. Si tratta di un fenomeno comunque raro e l'incidenza è stimata essere 1 caso ogni 75.000-100.000 gravidanze (Park et al., 2009).

Il 98% dei casi di APL è caratterizzato da uno specifico riarrangiamento genico che consiste nella traslocazione bilanciata e reciproca tra i cromosomi 15 e 17 (t(15;17)), con punti di rottura a livello della sequenza codificante per il recettore dell'acido retinoico sul cromosoma 17 e della sequenza codificante per la fosfoproteina PML sul cromosoma 15. Il gene di fusione che ne risulta (Fig. 1) codifica per la proteina di fusione PML/RAR α (Kogan et al., 1999).

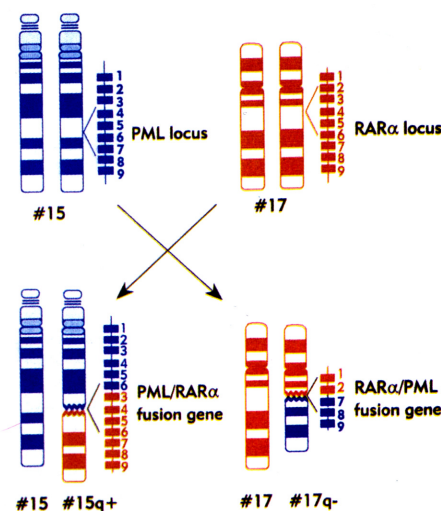


Figura 1. La traslocazione reciproca e bilanciata t(15;17) origina il gene di fusione *PML/RAR α* .

Nonostante il meccanismo non sia ancora del tutto noto, si ritiene che la tendenza alla traslocazione tra i cromosomi 15 e 17 sia dovuta alla loro vicinanza nella cromatina di precursori ematopoietici e all'identità di sequenza che i geni per PML e RAR α mostrano nei punti di rottura (Neves et al., 1999).

RAR α è un recettore nucleare facente parte della famiglia dei RARs (Retinoic Acid Receptors), proteine appartenenti alla superfamiglia di fattori di trascrizione

comprendente anche i recettori per gli ormoni steroidei e tiroidei. RAR α è un fattore di trascrizione ligando dipendente che agisce interagendo con specifici elementi di risposta (RAREs) situati nella regione del promotore dei geni interessati (Wang et al., 2008). La famiglia dei RARs comprende due classi di recettori: RARs (retinoic acid receptors) e RXRs (retinoid X receptors), entrambi presenti nelle tre isoforme α , β e γ . Ogni isoforma può controllare l'espressione di specifici geni e manifesta una diversa sensibilità all'acido retinoico, un derivato della vitamina A. E' stato infatti dimostrato che il fattore di trascrizione ligando-dipendente RAR α è stimolato dall'acido tutto *trans* retinoico (ATRA), mentre RXR α risponde sia all'ATRA che all'acido 9-*cis* retinoico (James et al., 1999).

La fosfoproteina PML è localizzata sia nel nucleo che nel citoplasma, ma una sua elevata espressione si osserva in un complesso multiproteico chiamato "PML nuclear body", che è coinvolto nel folding della cromatina. La distruzione di tale complesso potrebbe essere un passaggio importante nello sviluppo della APL (Jensen et al., 2001). PML è inoltre implicata nella soppressione della crescita e nella trasformazione delle cellule neoplastiche, oltre ad essere coinvolta nell'innescò della via apoptotica p53-dipendente e nella regolazione dell'espressione genica.

La proteina di fusione PML/RAR α interferisce negativamente nell'attività di soppressione della crescita delle cellule tumorali, permettendo la moltiplicazione dei promielociti immaturi (Fig. 2).

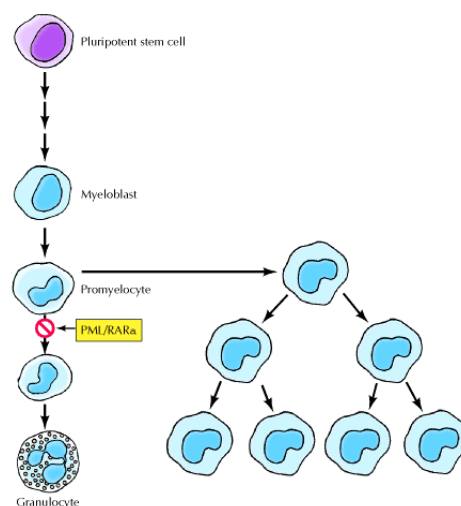


Figura 2. Blocco del processo differenziativo indotto dalla proteina di fusione PML/RAR α .

In particolare, la proteina chimerica si comporta da repressore trascrizionale di geni target del recettore dell'acido retinoico. Brevemente, 3 regioni del *locus* PML possono essere coinvolte nella traslocazione t(15;17). Queste regioni sono definite "breakpoint cluster regions" (bcr) e si localizzano nell'introne 6 (bcr1), nell'esone 6 (bcr2) e nell'introne 3 (bcr3). I punti di rottura nel *locus* RAR α si localizzano sempre nell'introne 2, che è lungo 17 kb. Di conseguenza, esistono tre possibili isoforme di PML/RAR α definite "long" (L o bcr1), "variant" (V o bcr2) e "short" (S o bcr3) (Park et al., 2009).

Un numero limitato di casi di leucemia promielocitica acuta è caratterizzato da anomalie cromosomiche che coinvolgono geni diversi da *PML*. In particolare, nello 0,8% dei pazienti affetti da APL si individua la traslocazione t(11;17), che coinvolge il gene che codifica per PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger) generando la proteina di fusione PLZF/RAR α . In questo tipo di APL si riscontra una totale non responsività al trattamento con ATRA, che dimostra come il partner di RAR α nella proteina di fusione giochi un ruolo fondamentale nel determinare le caratteristiche della malattia (Kogan et al., 1999). Come la proteina di fusione contenente PML, PLZF/RAR α può inibire lo sviluppo cellulare, probabilmente attraverso il legame a promotori, contrastando l'espressione di regolatori del ciclo cellulare (Sirulnik et al., 2003).

Un piccolo numero di casi di APL presenta altre traslocazioni cromosomiche, quali t(11;17)(q13;q21) e t(5;17)(q35;q21), che comportano la fusione di *RAR α* con i geni che codificano per le proteine NuMA (nuclear mitotic apparatus protein) e NPM (nucleophosmin), rispettivamente (Mistry et al., 2003).

Trattamento dei pazienti con APL

La cura dei disordini iperproliferativi delle cellule ematopoietiche si è basata per lungo tempo sull'utilizzo di chemioterapici, farmaci ad azione citotossica in grado di contrastare la proliferazione e l'invasività delle cellule neoplastiche. La chemioterapia prevedeva inizialmente il trattamento con daunorubicina e si basa attualmente sul trattamento combinato di una antraciclina (daunorubicina, idarubicina o altro) con la citosina arabinoside (Ara-C) (Wang et al., 2008). Se da un lato queste sostanze portano alla distruzione delle cellule tumorali, dall'altro esplicano un'azione cito-distruttiva per le cellule normali, tanto che a distanza di tempo possono presentarsi effetti collaterali anche di notevole gravità, quali sterilità, tumori secondari e deficit intellettivi.

Trattamento differenziante con ATRA

Da circa 20 anni il trattamento della APL si avvale di una strategia alternativa all'utilizzo dei chemioterapici: la terapia del differenziamento. Poiché il risultato della malattia è l'accumulo di cellule indifferenziate e non funzionali, questa permette di ripristinare la funzionalità delle cellule tumorali senza danneggiare le cellule sane. In tale contesto si inserisce una delle più importanti caratteristiche dell'APL, ossia l'elevata responsività delle cellule immature all'ATRA, un derivato della vitamina A, che costituisce dal 1986 il trattamento di elezione di questa forma di leucemia. L'impiego dell'ATRA è legato alla sua capacità di inibire la proliferazione cellulare e, contemporaneamente, di rimuovere il blocco maturativo dei promielociti inducendone il differenziamento (Kogan et al., 1999) (Fig. 3).

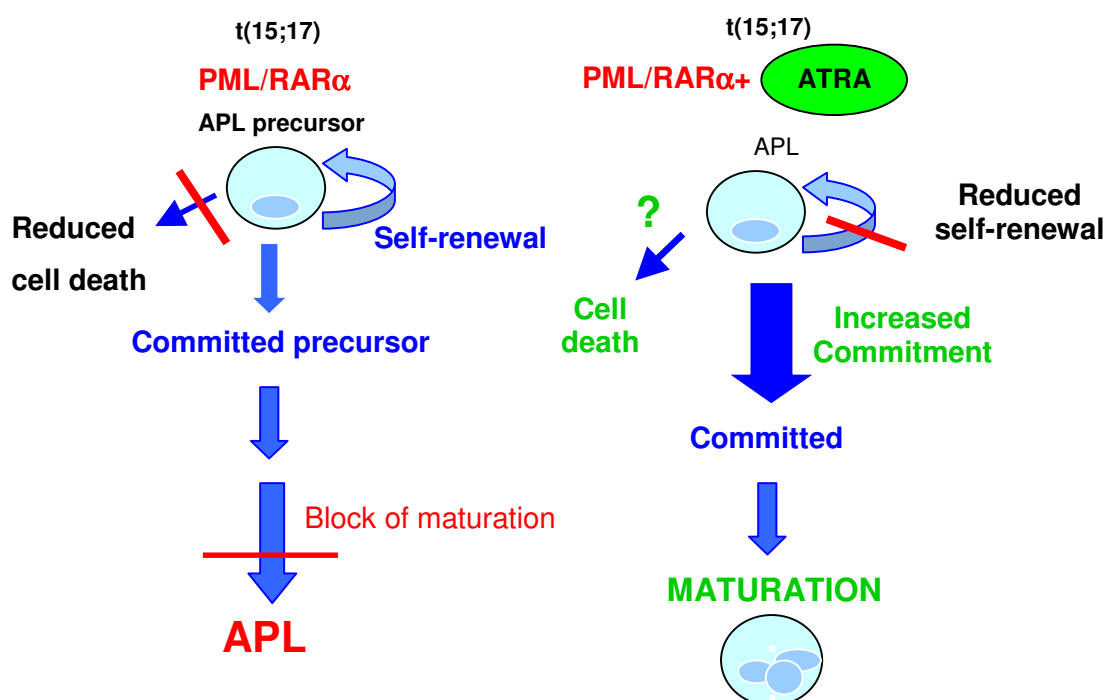


Figura 3. Rimozione del blocco differenziativo dei promielociti leucemici APL-derivati ad opera dell' ATRA.

L'ATRA svolge un ruolo essenziale in importanti processi fisiologici quali proliferazione e differenziamento cellulare, intervenendo in particolare nella regolazione dell'embriogenesi (Blaner et al., 2007), nel meccanismo della visione (Golczak et al., 2008) e nella riproduzione (Bowles et al., 2007). La scoperta, avvenuta all'inizio degli anni '80, che l'ATRA è in grado di interagire con la proteina chimerica PML/RARα

senza interferire con la funzione delle cellule ematiche normali, è stata la chiave dello sviluppo di una nuova strategia terapeutica nel trattamento della leucemia promielocitica acuta.

Nelle prime fasi di trattamento con ATRA, l'agonista fu somministrato a pazienti affetti da APL in prima diagnosi o che manifestavano ricaduta dopo uno o più cicli di chemioterapia. Il trattamento indusse una remissione completa nel 90% dei pazienti, ma nonostante questo apparente successo, invariabilmente tutti i pazienti trattati con solo ATRA andarono incontro a ricaduta. Questi primi studi sono serviti a stabilire che l'ATRA è efficace nell'indurre la remissione dell'APL ma che tale evento è di breve durata poiché la patologia, di solito, si ripresenta entro sei mesi dalla fine del trattamento ed inoltre la resistenza all'agonista si sviluppa rapidamente (Tallman et al., 2002; Avvisati et al., 2003). Dopo la ricaduta, infatti, i pazienti manifestano refrattarietà al trattamento per un periodo variabile tra i sei e i dodici mesi, dopo i quali è possibile riprendere la cura. Inoltre, il 15-25% dei pazienti sottoposti alla terapia con solo ATRA va incontro, entro i primi 10 giorni dal trattamento con l'agente differenziante, ad una patologia definita "Sindrome da ATRA" (RAS), una sindrome cardio-respiratoria caratterizzata da febbre, dispnea, infiltrati polmonari, effusioni pleurali e pericardiali, fenomeni episodici di ipotensione e danno renale acuto (Datta et al., 2003). La patogenesi non è ancora completamente nota ma nel corso della RAS si osserva il fenomeno dell'infiltrazione tissutale, durante il quale precursori mieloidi e granulociti maturi infiltrano diversi organi in seguito ad una modifica delle loro capacità adesive e della produzione di citochine, indotte dal trattamento con ATRA (Larson et al., 2003).

Per prevenire o ridurre gli effetti tossici e le ricadute a cui erano soggetti i pazienti con APL sottoposti a terapie a base di retinoidi è stata successivamente impostata una seconda fase sperimentale che prevedeva la riduzione del dosaggio giornaliero di ATRA e la sua combinazione con i classici chemioterapici (Sanz et al., 2003).

La conclusione di questi studi ha portato ad ottimizzare l'efficacia del trattamento, che attualmente prevede la somministrazione di ATRA, antracicline (idarubicina, daunorubicina, mitoxantrone o homoarringtonine) e Ara-C per l'induzione alla remissione, due cicli di chemioterapia per il consolidamento e, come terapia di mantenimento, ATRA in combinazione con basse dosi di chemioterapici (Tallmann, 2007; Wang et al., 2008). In tali condizioni, l'agonista è in grado di restaurare la funzione normale dei blasti APL e indurre la remissione in più del 90% dei pazienti affetti da questo tipo di leucemia. Sfortunatamente, anche in questo caso, un numero

sempre maggiore di pazienti trattati con successo e che dimostrano una remissione va incontro a ricaduta a distanza variabile dalla fine del trattamento. Inoltre, dopo un numero non prestabilito di cicli di somministrazione, così come era già emerso dai primi studi, un significativo numero di pazienti trattati con ATRA e chemioterapici sviluppa resistenza alle successive somministrazioni dell'agente differenziante (resistenza secondaria) e deve essere pertanto sottoposto a terapie alternative (De la Serna et al., 2008).

Generalmente, la resistenza all'ATRA può essere definita come l'impossibilità di raggiungere o sostenere la remissione ematologica completa da parte dei pazienti con APL in seguito a terapie basate sull'utilizzo di questo agonista. Si parla di resistenza primaria quando i pazienti, sebbene non siano mai stati sottoposti a precedenti terapie anti-leucemia, non mostrano di essere responsivi al trattamento con ATRA. Una percentuale ridotta (1%) di pazienti mostra tale refrattarietà, la cui causa sembra essere legata ad una variante aberrante della chimera PML/RAR α (Gu et al., 2002).

Per resistenza secondaria si intende una resistenza acquisita, che è estremamente comune in pazienti trattati continuativamente con ATRA. Sebbene l'incidenza dei casi di resistenza secondaria sia diminuito grazie all'utilizzo combinato dell'agente differenziante e chemioterapici, una quota consistente di pazienti ricade dopo la remissione completa ottenuta e consolidata con regimi contenuti di ATRA (Quezada et al., 2008).

Dal momento che il differenziamento di cellule APL-derivate dipende principalmente dal trasporto di una quantità sufficiente di ATRA al recettore nucleare RAR α in grado di modulare l'attività trascrizionale dei geni target, si ritiene che la resistenza secondaria possa svilupparsi principalmente in due modi: limitando l'accesso dell'ATRA ai suoi recettori (Gallagher, 2002) o in seguito ad aberrazioni dei recettori stessi e dei co-fattori necessari ad attivare specifici geni target (Miller, 2002; Avvisati et al., 2003).

Attualmente sono in corso studi su linee cellulari ottenute da pazienti resistenti al trattamento con ATRA per sviluppare terapie alternative. E' stato ad esempio studiato l'effetto antiproliferativo e pro-apoptotico del retinoide IIF (6-OH-11-O-hydroxyphenantrene), derivato dell'acido retinoico e ligando dei recettori RXR. I dati ottenuti hanno dimostrato che tale sostanza sopprime la proliferazione cellulare e induce l'apoptosi e che somministrando contemporaneamente IIF e acido valproico (VPA), l'inibitore dell'istone deacetilasi, gli effetti antiproliferativo e pro-apoptotico del retinoide si accentuano (Bartolini et al., 2008).

Trattamento con Triossido d'Arsenico

A partire dai primi anni '90 è stato osservato che l' As_2O_3 risultava molto efficace nella terapia di pazienti che manifestavano refrattarietà o che avevano sviluppato resistenza in seguito a trattamento con ATRA. Attualmente, il trattamento con As_2O_3 rappresenta la terapia di scelta da applicare a pazienti APL ricaduti o refrattari sui quali è in grado di indurre una remissione della patologia nell'80-90% dei casi (Tallman, 2007). Poiché anche in questo caso la remissione non è completa, è previsto, per questi pazienti come per quelli trattati con solo ATRA, il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (Tallman et al., 2008).

L'efficacia clinica dell' As_2O_3 ha fortemente stimolato l'attività di ricerca finalizzata alla comprensione del meccanismo tramite cui questa sostanza agisce. Nonostante numerose questioni rimangano tuttora aperte, i dati dimostrano che As_2O_3 possiede una doppia attività dipendente dalla sua concentrazione: da un lato induce un parziale differenziamento dei blasti APL e dall'altro innesca un meccanismo apoptotico causando la morte delle cellule leucemiche (Tallman, 2008; Wang et al., 2008). Evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'effetto pro-apoptotico è mediato da modifiche del contesto biochimico intracellulare, tra cui l'aumento di specie reattive dell'ossigeno, il rilascio di citocromo C e l'attivazione di diverse caspasi (Miller et al., 2002; Slack et al., 2002).

A basse concentrazioni, l' As_2O_3 può indurre blasti APL a differenziare parzialmente lungo la filiera granulocitaria. Il meccanismo attraverso il quale tale composto porta al differenziamento non è noto anche se è per lo più attribuibile alla degradazione di PML/RAR α . Diversamente da quanto si verifica con l'ATRA, la degradazione della chimera non coinvolge RAR α , ma prevede una modificazione di PML ad opera di Sumo-1, molecola che ne permette la specifica degradazione proteosomale (Miller et al., 2002).

Da studi condotti su un modello di APL costituito da blasti leucemici ottenuti da topi transgenici esprimenti PML/RAR α è emersa una sinergia d'azione tra As_2O_3 ed ATRA nell'indurre il differenziamento granulocitario (Lallemand-Breitenbach et al., 1999). Il trattamento simultaneo con ATRA e As_2O_3 induce inoltre la remissione in un tempo minore rispetto al trattamento con solo ATRA e la combinazione dei due agonisti può indurre la remissione della patologia in pazienti ricaduti che presentano resistenza ad entrambi gli agenti differenzianti somministrati singolarmente (Wang et al., 2008).

Terapie alternative al trattamento differenziante

I pazienti con APL che non rispondono positivamente alla somministrazione di ATRA e/o As_2O_3 vengono sottoposti a trattamenti alternativi alla terapia del differenziamento (Tallman et al., 2007). Tali approcci prevedono, ad esempio, l'utilizzo di un anticorpo monoclonale caliceamicina-coniugato (Gemtuzumab Ozogamicin, GO) diretto contro il CD33, un antigene di superficie ampiamente espresso in cellule leucemiche. Il riconoscimento del CD33 ad opera del GO risulta nella sua internalizzazione e nel rilascio idrolitico della caliceamicina che, a sua volta, causa un danno irreversibile al DNA e la morte cellulare (Walter et al., 2005).

Diverse sono le ragioni dell'efficacia di questo trattamento: innanzitutto l'antigene CD33 è espresso nel 100% dei casi di APL, la caliceamicina appartiene alla famiglia delle antracicline, un gruppo di agenti chemioterapici altamente efficaci nel trattamento dell'APL, e, infine, i blasti APL mancano della glicoproteina 170, responsabile della resistenza a sostanze chemioterapiche (Lo Coco et al., 2006; Wang et al., 2008).

GO è stato utilizzato con successo in combinazione con l'ATRA in pazienti affetti da APL non ancora trattata e, come singolo agente, dopo recidiva o in anziani che presentano la malattia ad uno stadio avanzato e che non sono quindi trattabili con chemioterapici (Ravandi et al., 2008).

Numerosi studi sono attualmente in corso per valutare l'efficacia di nuove sostanze nel trattamento della APL, quali gli inibitori del recettore tirosina chinasi di tipo 3 codificato dal gene *FLT3*, coinvolto nella proliferazione e nel differenziamento delle normali cellule staminali ematopoietiche. Studi su modelli murini hanno evidenziato una rapida regressione dell'APL in topi leucemici in seguito al trattamento combinato con il chemioterapico e SU11657, l'inibitore specifico di FLT3 (Lee et al., 2007).

Fattori prognostici nella terapia dell'APL

Attualmente, il maggior problema per i pazienti affetti da APL è l'identificazione, tra coloro che presentano recidiva, di quelli che continuano a reagire positivamente all'ATRA rispetto a coloro che invece perdono responsività al trattamento. Il primo gruppo può infatti continuare la cura con l'agente differenziante, mentre il secondo dovrà beneficiare di terapie alternative, come la somministrazione di As_2O_3 o di intensive dosi di chemioterapici.

Al momento, pochi metodi sono disponibili per prevedere l'eventuale comparsa di resistenza o una futura ricaduta della malattia. Attualmente, la conta dei globuli bianchi al presentarsi della malattia risulta essere il più importante fattore prognostico. Il 100% dei pazienti è considerato libero da ricaduta a 5 anni se ha una conta leucocitaria minore o uguale a $10 \times 10^9/L$ associata ad un numero di piastrine superiore a $40 \times 10^9/L$. Un ugual numero di globuli bianchi associato ad una presenza piastrinica inferiore o uguale a $40 \times 10^9/L$ rappresenta una prognosi intermedia e il 90% dei pazienti è libero da ricaduta a 5 anni. Infine, pazienti caratterizzati da una conta leucocitaria superiore a $10 \times 10^9/L$ si trovano in una condizione di elevato rischio di ricaduta con il 75% dei pazienti libero da ricaduta a 5 anni (Sanz et al., 2000; Mistry et al., 2003; Tallman et al., 2008).

Questa classificazione consente di individuare i pazienti a basso rischio, per i quali minimizzare o eliminare la chemioterapia è un obiettivo importante.

Fattori prognostici per un esito negativo e morte causata da emorragia sono costituiti da valori di creatinina anomali, aumento dei blasti periferici e presenza di coagulopatia. Anche l'età avanzata costituisce un fattore prognostico negativo (Tallman et al., 2008).

A scopo prognostico è correntemente utilizzata la quantificazione dei trascritti del gene *PML-RAR α* mediante "reverse transcriptase-polymerase chain reaction" (RT-PCR) (Lo Coco et al., 1992; Avvisati et al., 2003), sebbene l'identificazione di una positività a livello molecolare non sia strettamente correlata a una significatività prognostica.

Numerosi studi recenti annoverano tra i fattori associati ad una prognosi sfavorevole l'espressione dell'antigene di superficie CD56, che sembra essere coinvolto nel movimento delle cellule leucemiche (Tallman et al., 2008).

Il ritrovamento di duplicazioni in tandem interne al gene FLT3 può costituire un fattore prognostico negativo rispetto alla mortalità, ma l'impatto sulla ricaduta o la sopravvivenza è ancora poco chiaro (Tallman et al., 2008).

La presenza della variante bcr3 del trascritto codificante per la proteina di fusione PML/RAR α sembra costituire un ulteriore fattore prognostico negativo.

Poiché non esistono evidenze che l'attuale terapia debba essere modificata in base a questi fattori prognostici, al momento, solo la conta dei globuli bianchi, l'età ed il gruppo di rischio di appartenenza rimangono i fattori di riferimento (Tallman et al., 2008).

Attualmente si ritiene che pazienti a rischio di ricaduta basso o intermedio che hanno raggiunto una completa remissione dopo la terapia di consolidamento non necessitino della terapia di mantenimento. Ciò è molto importante in quanto recenti

studi hanno suggerito una correlazione tra la terapia di mantenimento e l'insorgenza di sindromi mielodisplastice e leucemie mieloidi acute secondarie alla remissione di APL (Tallman et al., 2008).

Molecole del signalling intracellulare coinvolte nel meccanismo di differenziamento granulocitario indotto da ATRA

Come precedentemente accennato, l'acido retinoico tutto *trans* agisce a livello intracellulare modulando l'espressione genica, quindi di proteine, tra le quali alcune a loro volta coinvolte nella regolazione della trascrizione genica.

Studi compiuti dal gruppo presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca hanno dimostrato il coinvolgimento di molecole correlate ai lipidi dell'inositolo nei meccanismi molecolari responsabili del differenziamento indotto dall'ATRA. I primi esperimenti, condotti sulle linee cellulari HL-60, hanno messo in evidenza come questo agonista moduli sia enzimi chiave del metabolismo dei fosfoinositidi, come la fosfolipasi C fosfoinositide-dipendente (PLC) e la fosfoinositide 3-chinasi (PI 3-K), che enzimi ad esso correlati, come la proteina chinasi C (PKC) e la proteina ad attività di scambiatore guanositico Vav1 (Bertagnolo et al., 2001 a). E' stato in particolare dimostrato come l'inibizione della crescita e l'induzione al differenziamento di promielociti APL-derivati trattati con ATRA siano accompagnate da modificazioni dei livelli delle diverse proteine sia nelle cellule in *in toto* che nel compartimento nucleare (Bertagnolo et al., 2001 a) (Fig. 4).

Per quanto riguarda PI 3-K, un enzima implicato in diversi meccanismi di trasduzione del segnale, che catalizza la fosforilazione in posizione 3 dell'anello dell'inositolo dei fosfoinositidi, questa è stata dimostrata essere essenziale nel differenziamento ATRA-dipendente della linea cellulare HL-60. I risultati ottenuti indicano in particolare che una modulazione negativa della sua quantità ed un'inibizione specifica della sua attività impediscono le modificazioni della morfologia nucleare tipiche del differenziamento lungo la filiera granulocitaria (Marchisio et al., 1998; Bertagnolo et al., 1999).

Studi più approfonditi del meccanismo attraverso cui la PI 3-K è reclutata e attivata durante il differenziamento delle cellule HL-60 hanno evidenziato che questa associa la

proteina adattatrice Vav1 in modo ATRA dipendente, sia nella cellula *in toto* che nel compartimento nucleare (Fig. 4). Lo stesso gruppo di esperimenti ha dimostrato come, in cellule HL-60 indotte a differenziare con ATRA, Vav1 formi complessi molecolari comprendenti, oltre alla PI 3-K, la tirosina chinasi Syk e le molecole adattatrici Cbl e SLP-76 (Bertagnolo et al., 2001 b) (Fig. 4). E' stato inoltre dimostrato che Vav1 media l'interazione di PI 3-K con componenti del citoscheletro, quali l'actina, e che tale interazione è essenziale per l'attività della PI 3-K stessa e per il verificarsi delle modificazioni nucleari tipiche del differenziamento granulocitario delle cellule HL-60 (Bertagnolo et al., 2001 b).

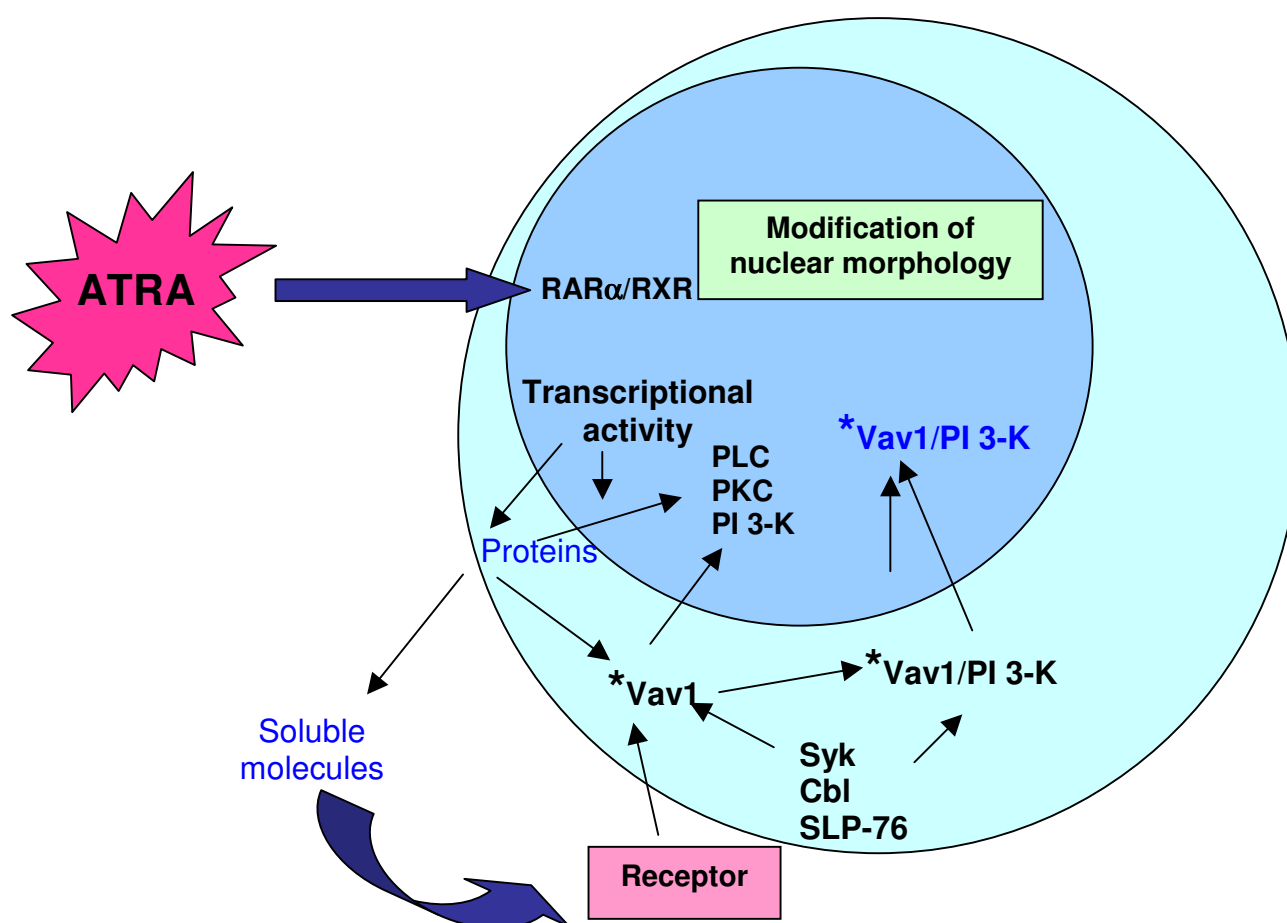


Figura 4. Schema riassuntivo delle molecole del signalling inositide-dipendente coinvolte nel meccanismo differenziativo attivato da ATRA in cellule HL- 60. L'asterisco indica una o più fosforilazioni in tirosina.

Un'indagine analoga è stata compiuta dallo stesso gruppo di ricerca sulla linea cellulare NB4 che, per la presenza della traslocazione t(15;17) costituisce il modello più idoneo per lo studio dell'APL.

E' stato dimostrato, in particolare, come l'isoforma $\beta 2$ di PLC, scarsamente presente nei promielociti APL-derivati, aumenti in quantità in seguito al trattamento con ATRA o As_2O_3 e correli positivamente con il livello di maturazione raggiunto dalle cellule differenzianti (Brugnoli et al., 2006). Contrastando l'aumento agonista-indotto di PLC- $\beta 2$ viene ridotta la capacità migratoria delle cellule differenzianti e la loro progressione lungo il ciclo cellulare (Brugnoli et al., 2007). Poiché, in questo modello sperimentale, PLC- $\beta 2$ interagisce con il suo substrato preferenziale fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP_2) associato all'actina, la risultante modulazione del pool di fosfoinositidi associati al citoscheletro può essere alla base del ruolo di PLC- $\beta 2$ nel modulare la migrazione e il ciclo cellulare di promielociti differenzianti, eventi che richiedono, entrambi, una profonda riorganizzazione dell'architettura citoscheletrica.

Come nelle cellule HL-60, anche nei promielociti NB4 la proteina Vav1 risulta scarsamente espressa ed i suoi livelli aumentano significativamente in seguito al trattamento con ATRA, in parallelo all'acquisizione di un fenotipo differenziato (Brugnoli et al., 2006).

La famiglia proteica Vav

Nel 1989, nel corso di alcuni esperimenti volti alla caratterizzazione di loci coinvolti in neoplasie umane, è stato identificato il prodotto del proto-oncogene *vav*, la proteina Vav1, la prima isoforma di una famiglia che comprende Vav2 e Vav3 nei mammiferi e *CeNav* nei nematodi (Bustelo, 2001). Il termine "vav" deriva dal nome della sesta lettera dell'alfabeto ebraico poiché il gene trasformante *vav* era il sesto isolato in quel laboratorio.

Indipendentemente dalle somiglianze strutturali, i geni *vav* dei mammiferi differiscono nella localizzazione cromosomica e nel pattern di espressione. In particolare, i geni umani *vav1*, *vav2* e *vav3* sono stati individuati sui cromosomi 19, 9 e 1, rispettivamente. Inoltre, nonostante tutti i geni di questa famiglia siano espressi nelle cellule ematopoietiche, i trascritti di *vav1* sono presenti nelle cellule del sangue in quantità maggiore rispetto a quelli di *vav2* e *vav3* (Tybulewicz, 2005).

Per quanto riguarda la distribuzione tissutale, Vav1 è presente fisiologicamente solo nelle cellule del sangue, sia della linea linfoide che mieloide, e in un numero estremamente esiguo di altri tessuti. Vav2 e Vav3 risultano invece avere una

distribuzione quasi ubiquitaria (Moore et al., 2000).

Sono state identificate alcune varianti di splicing per Vav1 e Vav2, almeno tre per quest'ultimo, che differiscono per la presenza di inserzioni nel dominio acidico, nel modulo PH e nella zona "linker" SH2-SH3. Sembra inoltre che queste varianti mostrino un pattern di espressione tessuto specifico (Tybulewicz, 2005).

Struttura modulare delle proteine Vav

Tutti e tre i membri della famiglia proteica Vav presentano una struttura modulare comprendente diversi domini (Fig. 5) che, a partire dall'estremità amino-terminale, sono:

- Un dominio di omologia con la Calponina (CH): si tratta di un dominio di circa 100 residui aminoacidici presente in molte proteine del citoscheletro che legano l'F-actina e che potrebbe quindi fornire a Vav1 una via di connessione al citoscheletro stesso (Hornstein et al., 2004). Il ruolo del dominio CH in Vav1 sembra essere particolarmente complesso, essendo coinvolto non solo nella regolazione dell'attività di Vav1 come Fattore di Scambio Guanosinico (GEF), ma anche nella mobilizzazione del Ca^{2+} con una azione a valle dei recettori MIRRs (Multi Subunit Immune Recognition Receptors) (Turner et al., 2002). E' stato inoltre dimostrato che tale dominio è in grado di legare vescicole composte da fosfatidilserina e fosfatidilinositolo, suggerendo una potenziale regolazione di questa proteina ad opera di lipidi (Bustelo, 2000, 2001).
- Un modulo Acidico (Ac), di circa 50 residui aminoacidici contenente tre residui di tirosina altamente conservati, coinvolti nel processo di regolazione dell'attività GEF di Vav1. Queste tirosine sono localizzate in una sequenza riconosciuta dalle proteine tirosina chinasi appartenenti alle famiglie Src e Syk/Zap70 (Bustelo, 2002) e corrispondono ai residui Y142, Y160 e Y174.
- Un dominio di omologia con Dbl (DH), uno scambiatore guanosinico appartenente alla famiglia delle Rho GTPasi, enzimi coinvolti in diverse funzioni biologiche come riorganizzazione del citoscheletro e crescita cellulare. Il dominio DH interagisce fisicamente con le Rho/Rac GTPasi, promuovendo lo scambio GDP-GTP (Bustelo, 2000, 2001).
- Un pleckstrin-homology domain (PH), dominio presente in molte molecole del signalling, che lega i fosfoinositidi come il PIP_2 e il fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato (PIP_3). Il dominio PH sembra avere un ruolo nella regolazione della attività di Vav1

come scambiatore guanositico mediante interazione intramolecolare con il dominio DH ed il legame con i fosfoinositidi (Turner et al., 2002).

- Un dominio Zinc-finger (C1), regione ricca di cisteine simile a quella che si trova nei membri della famiglia delle PKC. Mutazioni che inattivano questo dominio aboliscono l'attività GEF di Vav1 *in vitro* (Turner et al., 2002).
- Due domini SH3, che legano sequenze ricche in residui di prolina, fiancheggiando un dominio SH2, che interagisce con specifici residui di tirosina fosforilata. Tali domini mediano in generale l'interazione di Vav1 con altre proteine (Turner et al., 2002).
- Due sequenze di localizzazione nucleare (NLS), localizzate all'interno del dominio PH e tra i domini C1 e SH3 rispettivamente (Katzav, 2008).

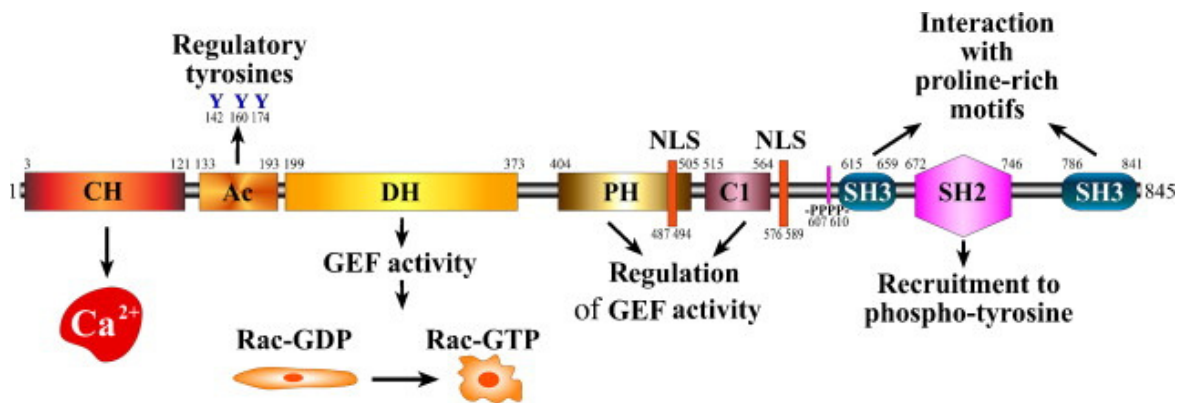


Figura 5. Struttura modulare della proteina Vav1 e principali funzioni correlate ai diversi domini.

Funzioni della proteina Vav1

La presenza nella struttura di Vav1 di domini funzionalmente diversi tra loro consente a questa proteina di svolgere molteplici ruoli, comuni a molecole variamente coinvolte nel metabolismo cellulare (Turner et al., 2002).

Attività enzimatica come scambiatore guanositico

La funzione più nota della proteina Vav1 è quella di fattore di scambio guanositico per le piccole GTPasi Rho, Rac e CDC42. Vav1, in particolare, agisce promuovendo il

rilascio del GDP dalle GTPasi inattive favorendo la successiva incorporazione di GTP e, pertanto, il raggiungimento di una conformazione attiva in grado di interagire con le molecole effettrici (Tybulewicz, 2005).

Il controllo dell'attività GEF di Vav1 è complesso e coinvolge, a differenza degli altri GEF, diversi sistemi di regolazione che prevedono una cascata di fosforilazioni sequenziali ad opera di tirosina chinasi (PTKs) (Chrencik et al., 2008). In particolare, la fosforilazione di Vav1 avviene in seguito al legame tra un agonista ed uno specifico recettore di membrana. Nel caso di recettori con attività tirosina chinasi intrinseca, Vav1 associa, attraverso il proprio dominio SH2, direttamente a residui di tirosina fosforilati delle molecole recettoriali. Quando, invece, i recettori stimolati sono privi di attività tirosina chinasi intrinseca, la fosforilazione di Vav1 prevede un complesso meccanismo che coinvolge PTKs citoplasmatiche e proteine adattatrici.

Come precedentemente accennato, i residui noti per regolare l'attività GEF di Vav1 sono le tre tirosine conservate 142, 160 e 174, localizzate nella regione Ac. La fosforilazione di tali residui di tirosina comporta un elaborato meccanismo intramolecolare che determina il rilascio di un loop auto-inibitorio nella struttura di Vav1, mediato innanzitutto dall'allontanamento dal dominio DH (Chrencik et al., 2008).

L'attivazione dell'attività GEF prevede inoltre l'interazione del dominio CH con il proprio ligando con il conseguente allontanamento del dominio C1. I domini DH e C1 formano una singola unità strutturale necessaria per stabilizzare la propria conformazione e, soprattutto, la disposizione spaziale del dominio DH, e per promuovere lo scambio nucleotidico. È stata infatti dimostrata l'esistenza di una tasca in grado di legare il substrato localizzata all'interfaccia dei domini C1 e DH (Rapley et al., 2008).

Un ulteriore meccanismo responsabile del controllo dell'attività enzimatica di Vav1 sembra essere rappresentato dalla alterazione della conformazione del dominio PH in seguito all'interazione con il PIP_3 . Per quanto riguarda quest'ultimo punto, sembra che il livello di attività di Vav1 sia regolato dalla presenza di diverse forme fosforilate del fosfatidilinositolo legate al dominio PH. Infatti, l'attività enzimatica *in vitro* di Vav1 fosforilato aumenta del doppio quando questo viene incubato con fosfatidilinositolo 3,4-bisfosfato ($PI(3,4)P_2$) o con PIP_3 , due prodotti dell'enzima PI 3-K. L'attività GEF di Vav1 è invece totalmente inibita quando il PIP_2 è incluso nel saggio.

Si ritiene che il dominio PH possa indirettamente intaccare l'attività di scambio di Vav1 *in vivo*, bloccando le interazioni dei substrati con le regioni DH e C1 (Bustelo, 2002).

Vav1 come proteina adattatrice

Studi condotti principalmente su cellule linfoide hanno attribuito alla proteina Vav1 funzioni indipendenti dalla sua attività di scambiatore guanosinico, grazie alla capacità d'interazione di questa con altre molecole coinvolte nella trasduzione del segnale intracellulare. La presenza nella sua struttura di un dominio SH2, di due domini SH3 e di 31 residui di tirosina potenzialmente fosforilabili, quindi in grado di interagire con i domini SH2 di altre molecole, tra cui Fyn, Shc, PLC- γ 1 e p85, fa sì che Vav1 possa fungere da adattatore e mediare in questo modo diverse risposte cellulari sia a livello citoplasmatico che nucleare (Bustelo, 2002; Hornstein et al., 2004; Tybulewicz, 2005).

Numerosi dati indicano che la stessa attività di Vav1 come molecola adattatrice dipende dalla sua interazione con altre proteine adattatrici. Tra queste, molecole che ne modulano i livelli di fosforilazione, proteine coinvolte nel signalling Vav-dipendente (CD19, CD28, LAT, SLP-76, BLNK), proteine che attivano vie di trasduzione del segnale che interagiscono con quelle attivate da Vav1 (SLP-76, BLNK) e altre con funzione sconosciuta ma attive nella via di trasduzione a valle di Vav1 (Bustelo, 2002).

E' stato inoltre dimostrato che Vav1 media la riorganizzazione del citoscheletro actinico in cellule T un meccanismo GEF-indipendenti che prevede l'interazione con proteine leganti l'actina in grado di regolarne la polimerizzazione. In particolare, Vav1 lega costitutivamente talina e vinculina, ancorando il citoscheletro actinico alla membrana plasmatica, e la proteina citoscheletrica zixina (Hornstein et al., 2004).

Ruolo di Vav1 nel compartimento nucleare

Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di Vav1 anche nel compartimento nucleare, sia in presenza di stimoli, come in cellule RBL (Rat Basophilic Leukemia) e linfociti T, che in condizioni basali, come nel caso di cellule Jurkat, promielociti HL-60 e NB4 e megacarioblasti UT7 (Margolis et al., 1992; Romero et al., 1996; Romero et al., 1998; Houlard et al., 2002; Bertagnolo et al., 2005; Gomez et al., 2005). Questa localizzazione della proteina anche all'interno del compartimento nucleare è giustificata sia dalla presenza, nella sua struttura, di due sequenze di localizzazione nucleare (NLS), che dalla possibilità per Vav1 di interagire con altre molecole trasportatrici (Katzav, 2007).

La localizzazione nucleare di Vav1 è regolata anche dal dominio SH3 carbossi-terminale, che agisce sequestrando la proteina nel citoplasma mediandone l'interazione

con specifiche proteine citoscheletriche o altre molecole citosoliche. Questo dominio potrebbe anche essere responsabile della formazione di una struttura intramolecolare che maschera il motivo NLS all'interno del dominio PH, mantenendo così Vav1 a livello citosolico (Katzav, 2007).

Diverse sono le evidenze sperimentali che indicano come Vav1 nucleare possa essere coinvolto nel controllo dell'espressione genica, attraverso interazioni con proteine responsabili del rimodellamento cromatinico o con fattori di trascrizione. Inoltre, la struttura di Vav1 contiene moduli comunemente riscontrabili in fattori trascrizionali, quali "helix-loop-helix", "leucin-zipper" e "zinc-finger" (Margolis et al., 1992), che potrebbero conferire allo stesso Vav1 un ruolo diretto nella regolazione della trascrizione genica.

Nel nucleo di cellule linfoidi, è stato riportato che la proteina Vav1 interagisce con il fattore NF-AT (Nuclear Factor of Activated T Cells), attivandolo e inducendo modificazioni del citoscheletro, flussi di Ca^{2+} e attivando la via Ras. L'attivazione di NF-AT da parte di Vav1 è un complesso processo che richiede il simultaneo reclutamento di proteine adattatrici e l'attivazione di vie di trasduzione del segnale regolate dall'attività catalitica di Vav1, nonché di un ruolo dello stesso Vav1 come proteina adattatrice (Tybulewicz, 2005).

In cellule RBL, Vav1 si accumula nel compartimento nucleare dopo stimolazione del recettore di membrana FcεRI e fa parte di un complesso trascrizionalmente attivo comprendente NF-AT sul sito di legame per questo fattore di trascrizione localizzato sulla regione promotrice dell'Interleuchina 2 (IL-2) (Houlard et al., 2002). In questo contesto, Vav1 potrebbe svolgere un ruolo nel compartimento nucleare agendo come proteina adattatrice coinvolta nella regolazione della fosforilazione o dell'assemblaggio di complessi trascrizionali.

In cellule linfoidi, è stato recentemente riportato che Vav1 e CD28 possono sinergizzare per la trascrizione del gene per l'IL-2. Inoltre, CD-28 lega la proteina Grb-2 ed è probabile che tale complesso funga da ponte per Vav1. L'incapacità di Grb-2 di legare CD28 impedisce a Grb-2 stesso di cooperare con Vav1 nella up-regolazione dell'attività del complesso NFAT/AP-1 (Schneider et al., 2008)

E' stato inoltre riportato che Vav1 interagisce, mediante il suo dominio SH3 carbossi-terminale, con proteine nucleari diverse dai fattori di trascrizione. Tra queste, la proteina Ku-70, una componente del complesso chinasi DNA-dipendente, la ribonucleoproteina hnRNP, coinvolta nei processi di maturazione dell'RNA e nel trasporto nucleocitoplasmatico, ed ENX-1, l'omologo umano di una proteina coinvolta

nei processi trascrizionali in *Drosophila* (Hobert et al., 1996; Romero et al., 1996, 1998). Studi compiuti, sia *in vitro* and *in vivo*, nelle cellule T indicano infine che Vav1 interagisce, sempre mediante il proprio dominio SH3 carbossi-terminale, con la proteina Sam68 (Src-associated in mitosis of 68 kD), che fa parte della famiglia di proteine in grado di legare l'RNA omologhe alla ribonucleoproteina hnRNPK (Hobert et al., 1996; Romero et al., 1996, 1998). La co-espressione di entrambe le proteine induce un aumento della localizzazione nucleare di Vav1 e modifiche della morfologia cellulare (Lazer et al., 2007).

Ruolo della fosforilazione tirosinica di Vav1

La fosforilazione tirosinica è uno dei meccanismi più versatili per regolare le funzioni delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale. Questa modificazione post-traduzionale può esercitare sia effetti positivi che negativi sull'attività biologica di numerose proteine, promuovendone le interazioni intramolecolari, le associazioni proteina-proteina o inducendo modificazioni allosteriche.

La maggior parte delle funzioni svolte dalla proteina Vav1 sono mediate da processi di fosforilazione in residui di tirosina ad opera di numerose tirosina chinasi, sia recettoriali che citoplasmatiche. Tra queste, tirosina chinasi appartenenti alla famiglia delle Src, Jak e Syk/Zap70 (Bustelo, 2002). La fosforilazione tirosinica di Vav1 può essere finalizzata alla regolazione della sua attività GEF come pure alla sua capacità di interagire con altre molecole del signalling intracellulare.

E' noto dalla letteratura che nel meccanismo di regolazione dell'attività GEF di Vav1 dovuto alla fosforilazione tirosinica svolgono un ruolo cruciale i residui tirosinici Y142, Y160 e Y174, che, come precedentemente accennato, sono altamente conservati e localizzati nella regione Ac di Vav1. In particolare, queste tirosine, nella forma non fosforilata, interagiscono con aminoacidi localizzati nel dominio DH, adiacente alla regione Ac, contribuendo a conservare l'intera proteina in uno stato inattivo (Chrencik et al., 2008).

Tutti e tre i residui tirosinici presenti nel dominio Ac di Vav1 sono inseriti all'interno di una sequenza aminoacidica che funge da sito consenso per diverse tirosina chinasi (Miletic et al., 2006). In particolare, tutte e tre le tirosine possono essere fosforilate da Lck, Zap70 e Syk (Amarasinghe et al., 2005; Prisco et al., 2005). Inoltre, le tirosine del

dominio Ac si trovano all'interno di siti di riconoscimento di numerose proteine implicate nella trasduzione del segnale a valle di TCR, quali la subunità regolatrice p85 dell'enzima PI 3-K e la PLC- γ 1.

Studi condotti su linfociti T hanno dimostrato come la mutazione di una singola tirosina presente nel dominio Ac non abbia un effetto significativo sulla fosforilazione complessiva di Vav1. Al contrario, la mutazione del residuo Y174 combinata con la mutazione di Y142 e/o Y160 risulta in una diminuzione sostanziale della fosforilazione di Vav1. La perdita di tutte e tre le tirosine porta ad un completo annullamento della fosforilazione tirosinica di Vav1.

Oltre ai residui tirosinici localizzati nella regione Ac, sono note altre sei tirosine, rispettivamente Y267, Y482, Y603, Y604, Y826, Y841, collocate all'interno di siti consenso conformi alla fosforilazione tirosinica ma non accessibili alle tirosina chinasi poiché non esposte sulla superficie o mascherate da interazioni intramolecolari (Miletic et al., 2006). Si ritiene che le tirosine presenti nella regione Ac funzionino come "docking sites" e/o facilitino l'accesso alla struttura di chinasi, come ad esempio di Lck, che possono fosforilare altri residui di tirosina. I tre residui di tirosina presenti nel dominio Ac sembrano quindi agire in qualità di controllori della fosforilazione tirosinica totale di Vav1 e sono importanti per il reclutamento delle tirosina chinasi stesse (Miletic et al., 2006).

Studi condotti su linee cellulari linfoidee e non suggeriscono che la fosforilazione dei residui di tirosina localizzati nella regione Ac possa essere richiesta anche per la regolazione dell'attività biologica mediata da Vav1 indipendentemente dalla sua attività GEF.

E' noto che la stimolazione di TCR induce la formazione di "microclusters", ovvero di complessi molecolari in cui avviene la fosforilazione tirosinica di proteine del signalling, la generazione di secondi messaggeri ed il riarrangiamento del citoscheletro (Miletic et al., 2006). Il residuo tirosinico 174 di Vav1 risulta necessario per la formazione ed il mantenimento dei "microclusters", probabilmente attraverso l'associazione con altre proteine. Al contrario, la mutazione dei residui 142 e 160 non determina alcuna variazione nella costituzione dei "microclusters", confermando quindi l'importanza del residuo Y174 in questo contesto (Miletic et al., 2006). Dato il ruolo che tale tirosina notoriamente svolge nella regolazione dell'attività GEF di Vav1 (Bustelo, 2001), è possibile che la deregolazione del signalling a valle di TCR che si verifica in seguito alla mutazione della tirosina 174 di Vav1 sia dovuta ad una iperattivazione della sua attività

GEF (Miletic et al., 2006).

Da quanto sopra riportato emerge che la fosforilazione tirosinica è al centro della regolazione di Vav1, sia positiva che negativa.

La regolazione positiva di Vav1 risulta coinvolta in diversi processi biologici, tra cui la riorganizzazione del citoscheletro, che porta a modificazioni della morfologia e della motilità cellulare, l'attivazione di cascate enzimatiche per la trasduzione del segnale e l'induzione dell'espressione di geni richiesti per lo sviluppo e per la proliferazione o il differenziamento cellulare (Tybulewicz, 2005).

In particolare, nelle cellule linfoidei, la fosforilazione tirosinica di Vav1 ne induce attività GEF-dipendente ed indipendente, principalmente coinvolta nella regolazione delle dinamiche citoscheletriche che si verificano durante la risposta immunitaria (Hornstein et al., 2004). Nelle cellule mieloidi, Vav1 fosforilato in tirosina sembra intervenire primariamente nei meccanismi di adesione e tras migrazione tissutale regolati dalle integrine (Coppolino et al., 2001).

La fosforilazione tirosinica svolge però anche un ruolo regolatorio negativo per la funzione delle proteine Vav. La tirosina 174, ad esempio, può regolare negativamente le funzioni di Vav1 sia legandosi ad altri domini strutturali di Vav1 e generando una conformazione inattiva, che blocca l'accesso di tirosina chinasi e di GTPasi, sia interagendo con proteine inibitrici (Lopez-Lago et al., 2000). Potenziali candidati come molecole inibitorie includono fosfatasi contenenti un dominio SH2, come la fosfatasi PTP-1C (protein tyrosine phosphatase-1C), o proteine inibitorie contenenti altri domini di legame per le fosfotirosine (PTB).

La regolazione negativa ad opera dei suoi residui tirosinici risulta essenziale per il ruolo che Vav1 svolge nei diversi tipi cellulari. Una mutazione nel residuo tirosinico 174 porta infatti ad un aumento della sua attività biologica *in vivo*, risultando in elevati livelli di trasformazione cellulare e costitutiva attivazione di altre risposte Rac-1/RhoG-dipendenti (Lopez-Lago et al., 2000). Gli effetti di questa mutazione possono essere ulteriormente incrementati da mutazioni che coinvolgono i residui tirosinici adiacenti Y142 e Y160.

Ruolo di Vav1 nelle cellule ematopoietiche normali

Come accennato precedentemente, Vav1 è fisiologicamente espresso nelle cellule emopoietiche dove esplica la sua attività mediando numerose risposte cellulari.

L'importanza funzionale di Vav1 per il differenziamento e le funzioni dei linfociti è stata ampiamente dimostrata, mentre in cellule ematopoietiche non linfoidi la proteina sembra essere piuttosto coinvolta nella riorganizzazione spaziale e temporale del citoscheletro durante la proliferazione e la fagocitosi delle cellule mature.

Ruolo di Vav1 nelle cellule linfoidi

Esperimenti compiuti su topi knock-out hanno dimostrato che Vav1 svolge un importante ruolo nella funzione dei linfociti T e dei linfociti B grazie alla sua fosforilazione in risposta all'attivazione di BCR (Complesso Recettoriale delle Cellule B) e di TCR (Recettore della Cellula T). La proteina si è inoltre rivelata essenziale per la maturazione delle cellule T, ma non delle cellule B (Turner, 2002).

In particolare, studi eseguiti con topi chimerici, generati utilizzando cellule staminali mancanti della proteina Vav1, mostrano una riduzione del numero di linfociti T periferici CD4⁺ e CD8⁺, dovuto ad un parziale blocco della maturazione di queste cellule nel timo. Inoltre, in assenza di Vav1, l'attivazione delle cellule T mature risulta deficitaria e i processi di proliferazione, di attivazione di molecole della trasduzione del segnale e di secrezione di citochine, indotti da TCR, risultano sensibilmente ridotti (Tybulewicz, 2005).

Nel midollo osseo di topi *Vav1*^{-/-}, *Vav2*^{-/-} e *Vav1*^{-/-} *Vav2*^{-/-} è stato evidenziato un pool di cellule B immature quantitativamente normale ma si osserva una riduzione delle cellule B circolanti mature (Doody, 2001; Tedford et al., 2001). Vav1 non sembra quindi essere direttamente coinvolta nello sviluppo delle cellule B nel midollo osseo, ma piuttosto richiesta per la maturazione periferica e la sopravvivenza di questo tipo cellulare.

Nelle cellule linfoidi, Vav1 è principalmente coinvolto nella regolazione delle dinamiche citoscheletriche che si osservano durante la risposta immunitaria (Hornstein et al., 2004; Tybulewicz, 2005). Il suo coinvolgimento in questo processo è stato dimostrato osservando come il rimodellamento del citoscheletro actinico, indispensabile per processi come divisione cellulare, adesione e motilità, sia ampiamente influenzato dall'attività della famiglia delle Rho GTPasi, di cui Vav1 è membro (Tybulewicz, 2005).

Sia nei linfociti T che B Vav1 è in grado di attivare NF-AT, mediando la trascrizione di geni per diverse citochine, come IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, il fattore GM-CSF, IFN- γ , TNF α . NF-AT è a sua volta coinvolto nella regolazione dell'espressione di diverse molecole immunoregolatrici sulla superficie delle cellule T, come CD40L e CTLA-4 (Katzav, 2004).

Ruolo di Vav1 nelle cellule mieloidi mature

Ruolo di Vav1 nei monociti/macrofagi. La migrazione dei macrofagi a livello del sito d'infezione è un evento biologico molto importante e viene attivato in risposta al rilascio di citochine nel sito d'infiammazione (Ridley, 2001). La chemiotassi è mediata da una coordinata organizzazione del citoscheletro di actina in risposta alla trasduzione del segnale avviata dal recettore per le chemochine.

E' noto dalla letteratura che, tra i membri della famiglia Vav, Vav1 e Vav2 sono espressi nei macrofagi. In particolare, Vav1 è localizzato a livello di "phagocytosis cups" ed è fosforilato in tirosina durante il fenomeno di fagocitosi, nel corso del "crosslinking" integrinico ed in risposta a diverse citochine, tra cui, MCSF (macrophage colony stimulating factor) (Gotoh et al., 1997; Vedham et al., 2005).

E' noto che macrofagi deficienti di Vav1 e Vav2 mostrano una ridotta area di diffusione. Inoltre, la sola mancanza di Vav1 induce una riduzione della velocità di migrazione mediata da MCSF e tale fenomeno è imputabile ad una minor formazione di microtubuli, dovuta ad una riduzione del livello di polimerizzazione della β -tubulina (Wells et al., 2005). Al contrario, macrofagi privi di Vav2 ma non di Vav1 mostrano esclusivamente un aumento del "ruffling" di membrana (Wells et al., 2005).

La chemiotassi dei macrofagi coinvolge l'enzima PI 3-K che, grazie alla produzione di fosfoinositidi fosforilati in posizione 3', richiama enzimi che contengono un dominio PH, quali proteine ad attività GEF (Servant et al., 2000). Utilizzando inibitori farmacologici di PI 3-K si è osservato che il legame del GTP al Rac e al cdc42 richiede l'attivazione di questo enzima (Keely et al., 1997). E' noto che Rac e cdc42 sono necessari per la migrazione chemioattrattiva delle cellule mieloidi, come viene dimostrato dalla scarsa risposta alla chemiotassi di granulociti neutrofili (Li et al., 2002), monociti macrofagi (Pradip et al., 2003) e cellule staminali ematopoietiche (Yang et al., 2001) di animali mancanti di Rac2.

Mentre risulta chiaro che Rac è importante per la risposta chemiotattica indotta da MCSF e che PI 3-K regola Rac, non sono ancora del tutto noti i meccanismi che portano all'attivazione di quest'ultima. Ciononostante, Vav1 sembra svolgere un ruolo primario, mediato dalla sua attività come scambiatore guanosinico, nell'attivazione di questa piccola GTPasi in seguito a stimoli chemioattraenti, dopo essere reclutato dai fosfoinositidi prodotti dall'attività enzimatica di PI 3-K (Vedham et al., 2005). Vav1 e Rac sembrerebbero pertanto essere essenziali per il fenomeno di chemiotassi macrofagica indotta da MCSF.

Ruolo di Vav1 nelle piastrine. Il processo di aggregazione piastrinica e gli eventi ad esso correlati coinvolgono la polimerizzazione ed il riarrangiamento dei filamenti di actina, grazie ai quali la piastrina attivata estende lamellipodi e filipodi, appiattendosi nel coagulo e, successivamente, contraendosi, unisce i bordi della ferita.

Studi condotti in topi Vav1-deficienti hanno dimostrato l'assenza di differenze nel numero di piastrine presenti nel sangue, rispetto ai topi wild-type. In accordo con ciò, piastrine Vav1^{-/-} vanno incontro alle caratteristiche modifiche che si osservano in risposta a diversi stimoli. Al contrario, anche se in piastrine mutanti negative per Vav1 la polimerizzazione dell'actina non è modificata, la loro aggregazione in risposta a CRP (Collagene-related Peptide) e trombina è ridotta. Questa apparente contraddizione può essere spiegata considerando la ridondanza dei membri della famiglia Vav, in particolare la presenza di Vav3, nelle piastrine (Pearce et al., 2002). L'adesione piastrinica al fibrinogeno porta alla fosforilazione in tirosina di Vav1, processo che dipende dall'attività chinasi di Syk. Nelle cellule aderenti al fibrinogeno la co-espressione di Syk e Vav1 è essenziale per l'attivazione di Rac (Miranti et al., 1998).

Ruolo di Vav1 nei granulociti neutrofili. E' noto che la stimolazione recettoriale ad opera di sostanze chemioattraenti in granulociti neutrofili non aderenti induce una complessa sequenza di eventi quali riorganizzazione dell'actina, modifiche morfologiche, sviluppo di polarità e adesione reversibile, tutte culminanti nella chemiotassi (Zhao et al, 2003).

Vav1 svolge un importante ruolo nella regolazione dell'attività di Rac2, associata all'attivazione della NADPH ossidasi, in neutrofili aderenti. Quando il patogeno è stato fagocitato, si osserva l'assemblaggio sulla membrana del fagosoma di un complesso NADPH ossidasi che catalizza la produzione di una serie di composti dell'ossigeno altamente tossici (superossido, ipoclorito, acqua ossigenata, ossido nitrico, radicali ossidrilici) che portano a morte i neutrofili stessi, a causa di un aumento transitorio del consumo di ossigeno (Respiratory Burst). Il processo di adesione dei neutrofili all'endotelio induce una iniziale riduzione della formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che rappresenta un meccanismo per prevenire il danno tissutale quando i leucociti migrano nel sito d'infiammazione. La GTPasi Rac2 è un importante componente del complesso NADPH ossidasi ed è stato dimostrato che la sua attivazione è correlata all'inibizione della formazione delle specie reattive dell'ossigeno. In particolare, l'attività GEF di Vav1 per Rac2 è inibita in cellule aderenti, come possibile

conseguenza dell'attivazione, mediata dall'adesione, di una o più tirosina-fosfatasi, responsabili della defosforilazione di Vav1 (Zhao et al., 2003).

Esperimenti condotti su topi *Vav1*^{-/-} hanno dimostrato che la motilità dei neutrofili *in vitro* e la mobilizzazione dei neutrofili nel sangue periferico *in vivo* indotta dal formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) è significativamente ridotta, così come la produzione di actina filamentosa (Kim et al., 2003).

La regolazione dei neutrofili mediata dalle integrine è essenziale per un'appropriata adesione e tras migrazione tissutale. Utilizzando neutrofili *Vav1*^{-/-}/*Vav3*^{-/-}, è stato dimostrato che le proteine Vav sono richieste per numerose funzioni dipendenti dall'integrina β2, che comprendono l'adesione, la diffusione e la fagocitosi mediata dal complemento (Gakidis et al, 2004).

Per quanto riguarda le chinasi responsabili dell'attivazione di Vav in questi processi, è stato osservato un incremento di Syk a livello dei lamellipodi in seguito alla migrazione indotta da FMLP in cellule HL-60 (Schymeinsky et al., 2006), dove colocalizza con le proteine Vav. La down-modulazione di Syk determina una riduzione delle capacità di adesione e di migrazione, indicando quindi come Syk svolga un ruolo fondamentale nel reclutare i neutrofili durante la risposta infiammatoria *in vivo* (Schymeinsky et al., 2006).

Ruolo di Vav1 in tessuti non ematopoietici

Il gene codificante per Vav1 mappa sul cromosoma 19p12-p13.2, una regione soggetta ad anomalie cariotipiche in diverse neoplasie ematologiche e tumori solidi umani (Katzav, 2007). Diversi studi indicano come Vav1 è over-espresso in diversi tessuti tumorali e linee cellulari neoplastiche (Tabella 1) (Katzav, 2007).

In particolare, in studi recenti è stato dimostrato come Vav1 sia presente in più del 50% dei campioni di adenocarcinoma pancreatico (PDA). Il silenziamento genico di Vav1 in linee cellulari di PDA contrasta la proliferazione cellulare *in vitro* e *in vivo* anche in presenza dell'oncogene K-Ras, sottolineando l'importanza di Vav1 in questa patologia (Katzav, 2008). Inoltre, i pazienti affetti da tumore pancreatico e positivi per Vav1 hanno una probabilità di sopravvivenza inferiore rispetto a quelli Vav1-negativi. Vav1 è stato ritrovato espresso anche in linee cellulari di melanoma, avvallando la tesi di un suo coinvolgimento in tale neoplasia (Katzav, 2008).

Elevati livelli di Vav1 sembrano essere associati al tumore al seno, in particolare a quello a prognosi peggiore (Lane et al., 2008).

In aggiunta a questi dati, che suggeriscono come Vav1 in tessuti non ematopoietici sia associato a tumori, è stata osservata l'over-espressione di questa proteina in blasti di leucemia linfatica cronica delle cellule B (Katzav, 2007).

Tabella 1. Coinvolgimento di Vav1 wilde-type in tumori umani		
<i>Tumore</i>	<i>Linea cellulare (RNA e proteina)</i>	<i>Analisi immunocistochimica</i>
Neuroblastoma	SK-N-MC	Positivo (75%)
Adenocarcinoma pancreatico	CAPAN2, CFPAC	Positivo (53%)
Melanoma	MiaPaCa2, BLM, Mel 57, MeWo	Positivo (melanoma metastatico – 4 campioni)
Leucemia linfatica cronica delle cellule B	Non testato	Positivo (34.4%)

Alti livelli di espressione di Vav1 sono stati riscontrati nel tumore al seno, in particolare in quello a prognosi meno favorevole.

L' over-espressione di wtVav1 può trasformare i fibroblasti NIH3T3.

Nelle cellule neoplastiche, Vav1 sembra essere coinvolto, in quanto GEF, in diversi processi cellulari quali motilità cellulare e migrazione, modifiche dell'adesione cellulare, riorganizzazione dell'actina e trascrizione genica, variamente implicati nel processo di sviluppo delle metastasi (Fig. 6) (Katzav, 2008).

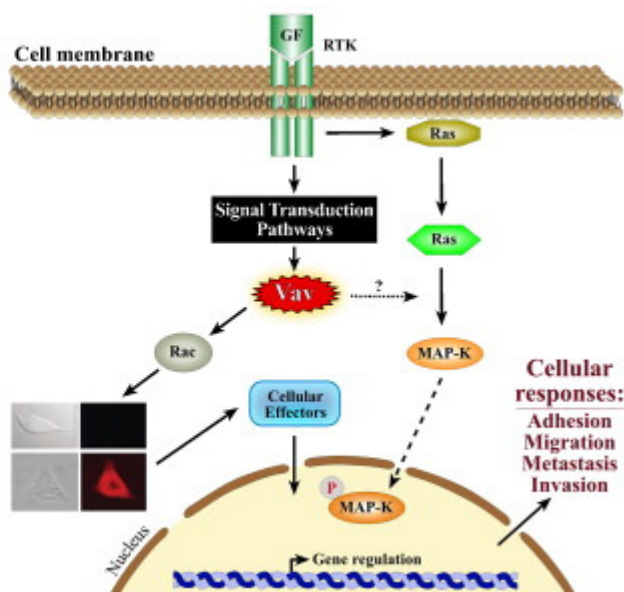


Figura 6. Attività biologica di Vav1 in cellule tumorali umane. Vav1 è fosforilato in tirosina in seguito all'attivazione del recettore tirosin chinasi (RTK) da parte di fattori di crescita (GF). Vav1 quindi funziona da GEF e da proteina scaffold portando alla trascrizione di geni coinvolti nel determinare il fenotipo maligno delle cellule.

Ruolo di Vav1 nel differenziamento di precursori mieloidi tumorali

Nei precursori mieloidi tumorali umani la fosforilazione tirosinica di Vav1 è stata osservata in cellule HL-60 dopo il "crosslinking" del recettore FcγRIIa1 (CD32) (Rouard et al., 1999) e in blasti di leucemia mieloide acuta stimolati dal G-CSF (Yuo et al., 1995). Diverse evidenze sperimentali indicano inoltre un coinvolgimento di Vav1 nella trasduzione del segnale di citochine o di fattori di crescita emopoietici.

Da diversi anni il gruppo a cui ho afferito per lo svolgimento della mia attività di ricerca si occupa dello studio dei meccanismi di trasduzione del segnale intracellulare innescati dall'ATRA nel corso del differenziamento granulocitario di cellule derivate da pazienti affetti da leucemia promielocitica acuta (APL), il sottotipo M3 delle leucemie mieloidi acute.

Vav1 promuove la maturazione a granulociti neutrofili di cellule APL-derivate

Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che, a differenza dei granulociti neutrofili di sangue periferico, caratterizzati da una forte espressione di Vav1, promielociti tumorali APL-derivati bloccati a diversi stadi di differenziamento neutrofilico mostrano bassi livelli di espressione della proteina (Bertagnolo et al., 2005). Il trattamento differenziante con ATRA induce un significativo aumento di espressione di Vav1 nelle linee APL-derivate HL-60 e NB4 così come in blasti ottenuti dal midollo osseo di pazienti affetti da APL (Bertagnolo et al., 2005) (Fig. 7).

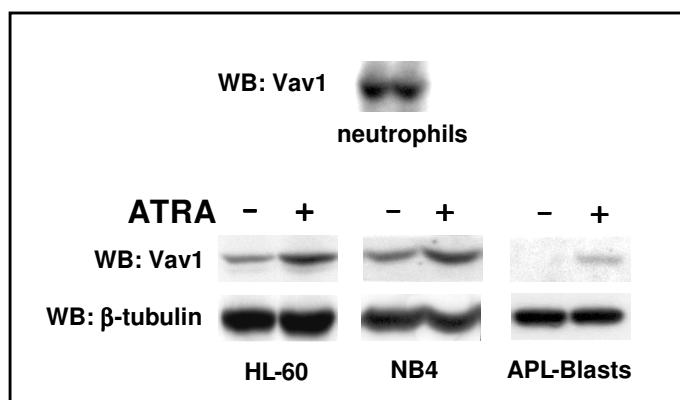


Figura 7. Espressione di Vav1 in granulociti neutrofili di sangue periferico, cellule APL-derivate HL-60 e NB4 e blasti-APL indotti a differenziare in senso granulocitario con ATRA.

Studi compiuti dallo stesso gruppo di ricerca hanno cercato di stabilire se Vav1 sia coinvolto nella regolazione degli eventi che determinano il processo differenziativo o se appartenga al pool proteico che assicura le funzioni della cellula matura, dimostrando che, in promielociti APL-derivati, un'adeguata espressione di Vav1 è necessaria per il completamento del processo maturativo. Infatti, quando Vav1 viene down-modulato mediante specifici siRNAs nel corso del trattamento con ATRA, al fine di contrastarne l'aumento di espressione indotto da questo agonista, le cellule raggiungono livelli di maturazione significativamente ridotti (Fig. 8) (Bertagnolo et al., 2005).

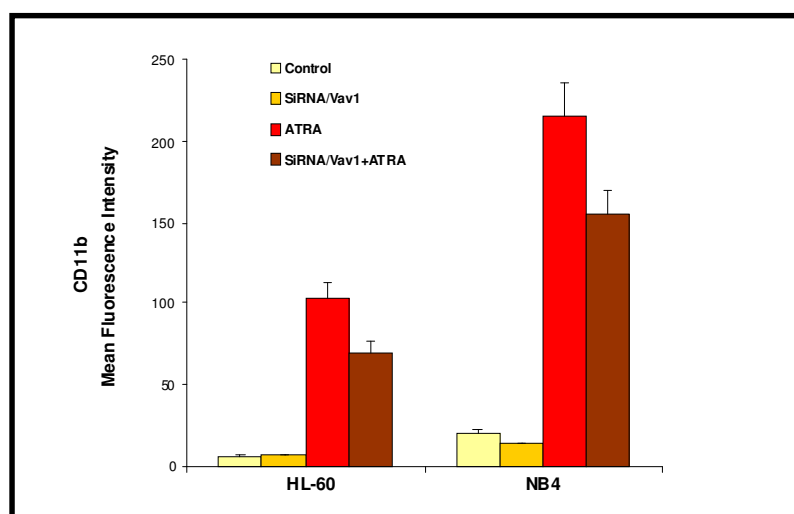


Figura 8. Analisi citofluorimetrica dell'espressione del marker di superficie CD11b in cellule HL-60 e NB4 indotte a differenziare con ATRA in presenza di una ridotta quantità di Vav1 (siRNA/Vav1).

Esperimenti in cui la quantità di Vav1 è stata up-regolata, mimando l'azione dell'ATRA, hanno permesso di stabilire che questa proteina promuove, in cellule HL-60, un aumento significativo dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b (Fig. 9). Un incremento dei livelli di differenziamento granulocitario è stato rilevato anche quando Vav1 è stato over-espresso in cellule HL-60 e NB4 indotte a differenziare con ATRA (Fig. 9). La sola over-espressione di Vav1 non è tuttavia sufficiente per modulare la morfologia nucleare, evento tipico del differenziamento in senso neutrofilico (Bertagnolo et al., 2005)

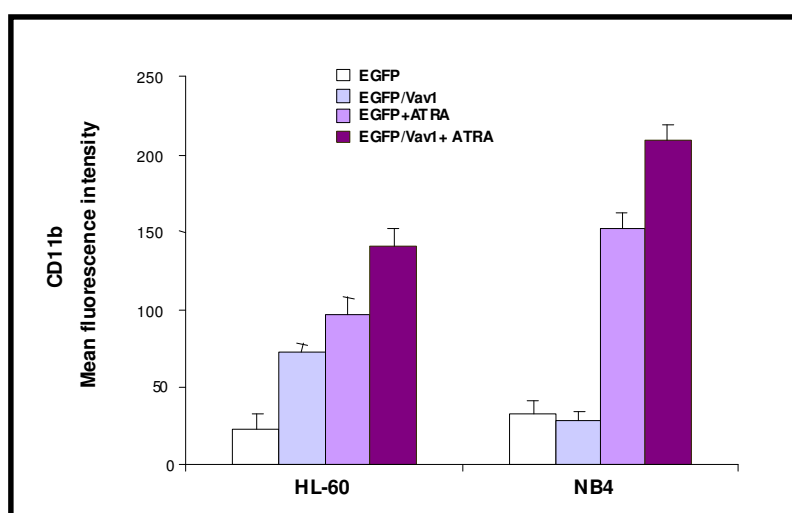


Figura 9. Analisi citofluorimetrica dell'espressione del marker di superficie CD11b in cellule HL-60 e NB4 over-esprimenti Vav1 (EGFP/Vav1) e indotte a differenziare con ATRA.

Lo stesso gruppo di ricerca ha inoltre dimostrato che, in seguito al trattamento differenziante con ATRA, Vav1 si accumula nel compartimento nucleare di entrambe le linee cellulari HL-60 e NB4 in una o più forme fosforilate in tirosina, suggerendo che il raggiungimento di una morfologia nucleare più differenziata richiede la fosforilazione tirosinica di questa proteina (Bertagnolo et al., 2005).

Studi compiuti sulla linea cellulare HL-60, hanno inoltre dimostrato che, durante il trattamento con ATRA, Vav1 prende parte a numerosi complessi proteici, che sembrano essere responsabili del reclutamento e dell'attivazione di questa proteina nel corso del processo maturativo (Bertagnolo et al., 2001 b). In particolare, è stata dimostrata un'associazione Cbl/Vav1 nel citoplasma e un complesso SLP-76/Vav1 nel compartimento nucleare di cellule differenziate (Bertagnolo et al., 2001 b) possibilmente correlati al diverso ruolo svolto da Vav1 nei diversi compartimenti cellulari.

Vav1 regola il citoscheletro/nucleoscheletro actinico nel corso del trattamento con ATRA di cellule HL-60

Esperimenti compiuti sulla linea cellulare HL-60 mediante l'utilizzo di inibitori farmacologici specifici per le tre principali famiglie di tirosina chinasi note per essere in grado di fosforilare Vav1, quali Syk/Zap-70, Src e Jak, è stato dimostrato che la tirosina chinasi Syk fosforila Vav1 in cellule differenzianti. Tale risultato è stato confermato da specifici saggi di attività *in vitro* e dall'utilizzo di Picetannolo (Fig. 10A), inibitore farmacologico della famiglia Syk/Zap-70 ed in particolare della tirosina chinasi Syk (Bertagnolo et al., 2001 b).

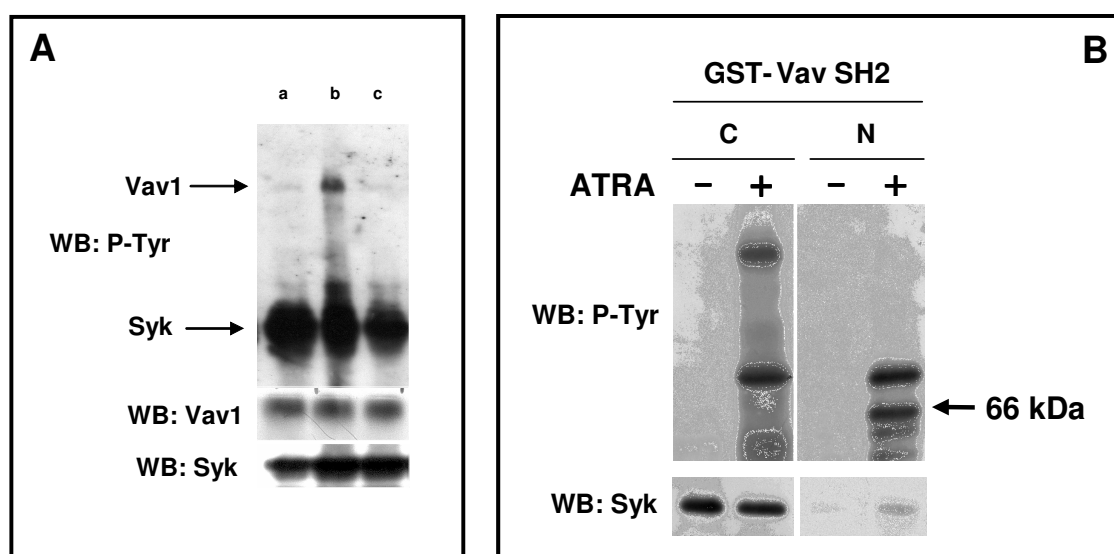


Figura 10. In A, saggio di attività Syk-chinasica *in vitro* che dimostra come in cellule HL-60 differenzianti Syk fosforili Vav1 (a: controllo; b: ATRA; c: ATRA+Picetannolo). In B, saggio di adsorbimento che dimostra come il dominio SH2 di Vav1 associa la tirosina chinasi Syk fosforilata, sia nella cellula *in toto* che nel compartimento nucleare di cellule HL-60 differenzianti.

Attraverso esperimenti di adsorbimento è stato dimostrato che Vav1 interagisce con la tirosina chinasi Syk fosforilata attraverso il proprio dominio SH2 (Fig. 10B) (Bertagnolo et al., 2001 b).

La riduzione della fosforilazione tirosinica di Vav1 dipendente da Syk nel corso del differenziamento granulocitario ATRA-dipendente delle cellule HL-60 non modifica significativamente l'espressione dell'antigene di superficie CD11b (Fig.11 A), marcatore del differenziamento mieloide, ma previene le modificazioni della morfologia nucleare che caratterizzano la condizione differenziata (Fig.11 B). Ciò suggerisce che la fosforilazione tirosinica Syk-dipendente di Vav1 in questo modello cellulare è deputata alla regolazione del citoscheletro.

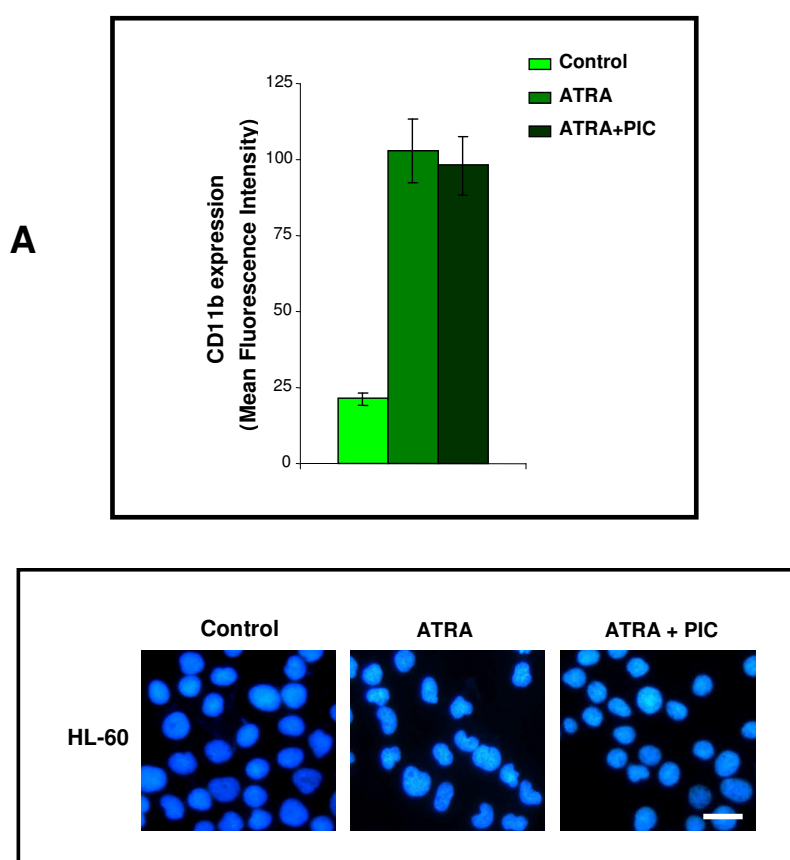


Figura 11. Valutazione citofluorimetrica dell'antigene di superficie CD11b (A) e della morfologia nucleare (B) in cellule HL-60 indotte a differenziare in presenza di Picetannolo (PIC), in grado di inibire la fosforilazione Syk-dipendente di Vav1.

Come descritto precedentemente, la funzione meglio nota per Vav1 fosforilato in tirosina è l'attività GEF, che determina modificazioni citoscheletriche correlate all'azione di GTPasi. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che l'attività GEF di Vav1 non sembra essere coinvolta nei cambiamenti morfologici indotti dall'ATRA nelle cellule HL-

60 (Bertagnolo et al., 2004), indicando che devono essere attivati da Vav1 meccanismi alternativi per promuovere modifiche nel citoscheletro di promielociti tumorali differenzianti.

Studi finalizzati a stabilire il ruolo di Vav1 nelle modificazioni fenotipiche che accompagnano il differenziamento ATRA-indotto delle cellule HL-60 hanno dimostrato che Vav1 associa l'enzima PI 3-K. Tale interazione coinvolge una o più tirosine fosforilate di Vav1 ed entrambi i domini SH2 presenti nella subunità regolatrice p85 dell'enzima (Bertagnolo et al., 2001 b). Quando Picetannolo viene somministrato nel corso del trattamento con ATRA, l'interazione Vav1/p85 è contrastata indicando che Syk fosforila residui tirosinici di Vav1 coinvolti nella sua associazione con PI 3-K (Bertagnolo et al., 2001 b). L'interazione Vav1/PI 3-K sembra essere finalizzata all'attivazione dell'enzima ed alla sua associazione con l'actina. (Bertagnolo et al., 2004) (Fig. 12). Poiché, quando l'interazione PI 3-K/actina dipendente da Vav1 è abrogata, la produzione di 3-fosfoinositidi è fortemente ridotta (Bertagnolo et al., 2004), è possibile che questo meccanismo possa permettere a PI 3-K l'utilizzo dei suoi substrati associati al citoscheletro actinico (Fig. 12). Questo risulta in modifiche del pool di fosfoinositidi che, come noto, gioca un ruolo cruciale nel modulare la riorganizzazione dell'architettura citoscheletrica (Takenawa et al., 2001).

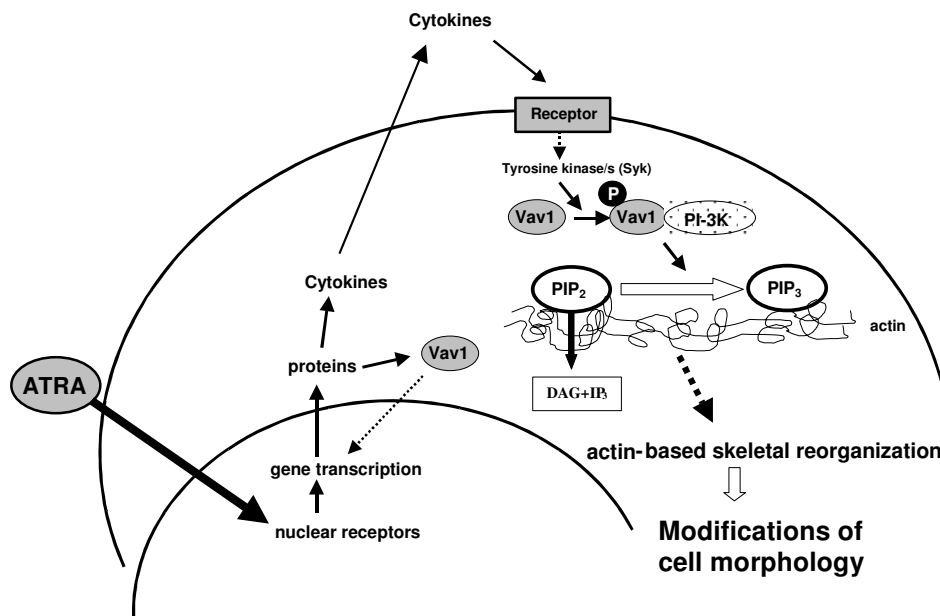


Figura 12. Rappresentazione schematica dei meccanismi molecolari che coinvolgono Vav1 nelle modificazioni del citoscheletro actinico indotte da ATRA in cellule HL-60.

Dalla letteratura è noto che l'ATRA attiva la trascrizione di geni con azione differenziante, tra cui citochine e recettori per citochine (Visani et al., 1996; Hsu et al., 1999). Poiché Vav1 fosforilato in tirosina si accumula nel nucleo di promielociti tumorali che raggiungono un significativo livello di maturazione in seguito al trattamento differenziante, è stato studiato l'eventuale ruolo della proteina nella modulazione dell'espressione genica indotta da ATRA. A tale scopo, l'espressione e la fosforilazione tirosinica di Vav1 sono state inibite durante il trattamento con ATRA di cellule HL-60 e ne è stato valutato l'effetto sulla trascrizione di geni per citochine e recettori per fattori crescita mediante l'utilizzo di macroarrays. Sono stati così identificati 8 geni indotti dall'ATRA (Tabella 2) la cui trascrizione viene down-modulata in seguito all'inibizione di Vav1. Tra questi il gene Notch1, coinvolto nel "commitment" dei progenitori emopoietici e il gene per la Timosina β 10, una molecola coinvolta nella riorganizzazione del citoscheletro actinico (Bertagnolo et al., 2005).

Tabella 2. Geni la cui espressione, aumentata in seguito al trattamento con ATRA, diminuisce quando il differenziamento avviene in presenza di ridotti livelli di fosforilazione Syk-dipendente di Vav1.

GenBank Accession number	Gene/Protein Name	Gene/Protein Classification
M37435	MCSF	Growth Factors, Cytokines
M86492	glia maturation factor β (GMF- β)	Growth Factors, Cytokines
X53655	neurotrophin 3 (NT3)	Proteins Neuropeptides
X85960	trk-T3	Protein Kinase Receptors
X06374	platelet-derived growth factor A subunit	Growth Factors, Cytokines
M99437	notch homolog	Oncogenes & Tumor Suppressors
D16431	hepatoma-derived growth factor (HDGF)	Growth Factors, Cytokines
M92381	thymosin β -10 (TMSB10)	Growth Factors, Cytokines

L'insieme dei dati sopra riportati indica che adeguati livelli di Vav1 sono richiesti per la maturazione di precursori ematopoietici mieloidi tumorali APL-derivati, dove agisce promuovendo una parziale maturazione e potenziando il processo maturativo innescato dall'ATRA, possibilmente contribuendo alla regolazione della trascrizione genica (Fig. 12).

OBIETTIVO

Il lavoro riportato in questa tesi si inserisce in un filone di ricerca che ha in precedenza chiarito diversi aspetti concernenti la distribuzione ed il ruolo funzionale di Vav1 nel corso del differenziamento granulocitario di precursori normali e tumorali.

Sulla base dei risultati finora ottenuti e riportati nella sezione precedente, il primo scopo del lavoro presentato in questa tesi è stato quello di determinare il possibile ruolo di Vav1 nella regolazione dell'espressione del pool proteico attraverso il quale l'ATRA porta a termine il programma maturativo dei precursori APL-derivati. Per realizzare tale obiettivo, è stata compiuta un'indagine proteomica sulle linee cellulari HL-60 e NB4 indotte a differenziare in presenza di una ridotta quantità o fosforilazione tirosinica di Vav1. In particolare, l'espressione di Vav1 è stata down-modulata mediante la tecnica del siRNA e la sua fosforilazione tirosinica mediante l'utilizzo di Picetannolo, specifico per la tirosina chinasi Syk.

Il secondo obiettivo del lavoro presentato in questa tesi è stato quello di identificare il/i residuo/i tirosinico/i di Vav1, fosforilato/i durante il trattamento con ATRA e funzionalmente coinvolto/i nel superamento del blocco differenziativo di promielociti tumorali APL-derivati. A tale scopo, Vav1 immunoprecipitato da cellule di controllo e differenzianti è stato sottoposto ad analisi mediante spettrometria di massa.

Un ulteriore aspetto che il nostro studio ha voluto chiarire è stato quello di stabilire se i residui tirosinici localizzati nel dominio SH2 di Vav1, che associa Syk nelle cellule HL-60 differenzianti, costituiscono possibili substrati della chinasi. A tale proposito, cellule HL-60 sono state transfettate con costrutti contenenti il gene di Vav1 mutato nelle triplette codificanti per i residui tirosinici presenti nel dominio SH2 della proteina e l'effetto delle singole mutazioni è stato valutato in diversi aspetti del processo differenziativo indotto da ATRA.

MATERIALI E METODI

Modello sperimentale

Per la conduzione degli esperimenti riportati in questa tesi sono state utilizzate le linee cellulari HL-60 e NB4 indotte a differenziare in senso granulocitario. Tutti i reagenti impiegati, ove non diversamente indicato, sono stati forniti da Sigma (Sigma Chemicals, St Louis, MO).

La linea cellulare HL-60 (ATCC CCL-240, Rockville, MD) è costituita da promielociti che, pur derivando da una paziente affetta da APL, non presentano la traslocazione cromosomica t(15;17) tipica di questa patologia (Breitman et al., 1980).

La linea cellulare NB4, derivata da un paziente affetto da APL, è caratterizzata dalla tipica traslocazione t(15;17) ed è stata ottenuta dalla German Collection of Microorganism and Cell Cultures (Braunschweig, D).

Entrambe le linee cellulari sono state coltivate in terreno RPMI-1640 (Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, B) addizionato di 10% di FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco Laboratories, Grand Islands, NY) e di 1% di penicillina/streptomicina (Bio Whittaker), in un ambiente umidificato contenente il 6% di CO₂, ad una densità compresa tra 5x10⁵/ml e 1,5x10⁶/ml.

Il differenziamento granulocitario di entrambe le linee cellulari è stato indotto aggiungendo al terreno di coltura 1 µM ATRA solubilizzato in etanolo assoluto, avendo cura che la concentrazione finale dell'alcool fosse comunque inferiore allo 0,1%, secondo quanto indicato da Lanotte e collaboratori (Lanotte et al., 1991).

Una metodica classicamente descritta in letteratura e da noi utilizzata per monitorare il differenziamento granulocitario consiste nella valutazione dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b. Per tale analisi, circa 5x10⁵ cellule sono state centrifugate per 10 min a 850 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Milano, I), risospese in PBS contenente il 2% di FBS a 4°C e successivamente incubate per 1 h con un anticorpo anti-CD11b umano coniugato con ficoeritrina (PE) (Immunotech, Coulter, Marsiglia, F). L'eccesso di anticorpo fluorescente è stato eliminato mediante lavaggio con 1 ml di PBS freddo addizionato di 1% FBS. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in PBS e la fluorescenza associata alle cellule, corrispondente all'espressione del CD11b, è stata analizzata mediante citometro a flusso (FACScan, Beckton Dickinson,

San Josè, CA). I dati, raccolti su almeno 10.000 cellule, sono stati rappresentati come valore dell'intensità della fluorescenza cellulare media.

Negli esperimenti nei quali è stata inibita la fosforilazione Syk-dipendente di Vav1, le cellule HL-60 e NB4 sono state trattate per 4 giorni con 1 µl/ml di Picetannolo, inibitore specifico della tirosina chinasi Syk, sia in condizioni di controllo che in presenza dell'agente differenziante.

Down-modulazione dell'espressione di Vav1 mediante la tecnica del siRNA

Per ridurre l'espressione della proteina Vav1 in entrambe le linee cellulari è stata impiegata la tecnica del siRNA (small interfering RNA), secondo una procedura messa a punto nel nostro laboratorio (Bertagnolo et al., 2005). Le sequenze di RNA a doppia elica sono state disegnate selezionando 4 regioni codificanti nel messaggero di Vav1 e seguendo le regole (sequenza generica del tipo AA(N19)dTdT con 2-desossitimine protrudenti in 3' e contenuto di ~50% in basi G/C) dettate dalla ditta produttrice (Qiagen, Milano, I).

Il siRNA liofilizzato è stato solubilizzato in una soluzione sterile contenente 100 mM CH₃COOK, 30 mM HEPES-KOH pH 7,4 e 2 mM (CH₃COO)₂Mg, mediante incubazione a 90 °C per 1 min e a 37 °C per 14 min.

A 24 h dalla semina, le cellule HL-60 e NB4 sono state transfettate con una miscela delle quattro sequenze di siRNA mediante elettroporazione secondo la seguente procedura: 8 µg di siRNA sono stati aggiunti a 2x10⁶ cellule in 100 µl di RPMI-1640 contenente 20% di FBS in cuvette per elettroporazione (4MM Cuvette W/IN, Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le cellule sono state quindi elettroporate (250 V per 20 msec o 30 msec con elettroporatore Electro Square Porator ECM 830, BTX, Genetronics, Inc, San Diego, CA), quindi diluite in 600 µl di RPMI-1640 contenente il 20% di FBS. In parallelo, è stata effettuata una transfezione con sequenze di RNA non codificanti coniugate con fluoresceina, allo scopo di valutare, mediante analisi citofluorimetrica, l'efficienza di transfezione, che è risultata essere di circa il 60% nella maggior parte degli esperimenti.

Le cellule, a 5 h dalla transfezione, sono state trattate con ATRA e dopo 96 h sono state sottoposte ad analisi immunochimica per valutare l'avvenuto silenziamento di Vav1, ad analisi citofluorimetrica dell'antigene di superficie CD11b, per valutare il livello di

differenziamento raggiunto, nonché ad analisi proteomica.

Elettroforesi bidimensionale

L'elettroforesi bidimensionale è una tecnica di separazione su gel che consente di risolvere diverse centinaia di proteine alla volta sfruttando una duplice separazione delle miscele complesse. La prima separazione opera in funzione del punto isoelettrico, la seconda consente di separare le proteine in base al loro peso molecolare, originando una mappa di spot corrispondenti a proteine che possono essere identificate e caratterizzate.

Preparazione del campione

Le cellule sono state centrifugate a 900 rpm (Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments, Milano, I) per 10 min a 4°C e il pellet è stato lavato due volte con 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 contenente 250 mM saccarosio, per eliminare l'eccesso di sali che interferiscono con la separazione in prima dimensione. Le cellule sono state quindi lisate in tampone di solubilizzazione TSU (7 M Urea, 2 M Tiourea, 4% CHAPS, 1% DTT e 0,8% Anfoline pH 3-10) addizionato di inibitori delle proteasi (HALT™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free Pierce, Rockford, IL) e di inibitori di RNAsi e DNAsi (Benzonase® Nuclease, Novagen EMD Biosciences, Darmstadt, D). Dopo 30 min di incubazione a 30°C per favorire l'attività degli inibitori, il lisato cellulare è stato sonicato in bagnetto ad ultrasuoni (due cicli da 15 min) quindi chiarificato mediante centrifugazione a 13.000 rpm (Biofuge Fresco, Heraeus Instruments) per 60 min a 4°C. Il dosaggio proteico del supernatante è stato effettuato utilizzando il BioRad Protein Assay (Bio-Rad), seguendo le istruzioni del fornitore.

Isoelettrofocalizzazione

Negli esperimenti di proteomica, la preparazione del campione è seguita dalla isoelettrofocalizzazione (isoelectrofocusing, IEF). L'IEF è effettuata utilizzando supporti di plastica su cui sono adese strisce di gel di poliacrilammide (strip) contenenti carrier anfolitici o immobiline (IPG) in grado di creare un gradiente di pH.

Negli esperimenti riportati in questa tesi, l'IEF è stata effettuata utilizzando strips di 17 cm (Bio-Rad) a intervallo di pH 4-7 e la separazione delle proteine è stata ottenuta con l'ausilio del PROTEAN IEF cell (Bio-Rad), secondo una procedura messa a punto nel

nostro laboratorio (Bertagnolo et al., 2008). In particolare, è stata eseguita una reidratazione attiva della strip a 50 V per 16 h, è stato quindi applicato un voltaggio di 500 V per 30 min, di 1.000 V per 30 min, di 5.000 V per 1 h, di 10.000 V per 1 h ed infine di 10.000 V per 8 h per un totale di 80 kWh (prodotto del voltaggio erogato per il tempo di erogazione).

Separazione elettroforetica ed analisi delle mappe proteiche

Prima di effettuare la separazione delle proteine in base al peso molecolare (SDS-PAGE), si è proceduto a ridurre ed alchilare le proteine stesse. Le strips sono state pertanto incubate dapprima con un tampone di equilibratura (6 M Urea, 2% SDS, 5 mM Tris HCl, pH 8,6 e 30% glicerolo) contenente 125 mM DTT per 15 min a temperatura ambiente, quindi con lo stesso tampone di equilibratura aggiunto di 250 mM iodoacetamide (IAA) per 8 min.

Le strip sono state applicate ad un gel di poliacrilammide al 12% e, previa erogazione di 45 mA per 30 min per ogni gel sottoposto a migrazione, la separazione delle proteine è avvenuta a 8 mA per gel.

Dopo la separazione in seconda dimensione, gli spots proteici sono stati visualizzati tramite colorazione del gel di poliacrilammide con Blu Coomassie colloidale. La soluzione madre era costituita da 10% H₃PO₄ (Analar, BDM Chemicals LTD, Poole, UK), 10% (NH₄)₂SO₄ e 0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250. Al momento dell'uso, la soluzione colloidale è stata diluita con il 20% di metanolo. Il gel è stato sottoposto a colorazione over-night a 4°C e l'eccesso di colorante è stato quindi rimosso con lavaggi in acqua bidistillata.

L'acquisizione dei gels bidimensionali colorati con Blue Coomassie colloidale è stata effettuata con densitometro GS-800 (Bio-Rad). Le immagini sono state analizzate utilizzando il programma PDQuest Basic Version 8.0 software (Bio-Rad), allo scopo di individuare spots la cui intensità variava nelle diverse condizioni sperimentali.

In particolare, la densità di ogni spot è stata normalizzata secondo la densità totale degli spots validi oppure, quando erano presenti spots con densità che raggiungeva il livello di saturazione, secondo la densità dell'intera immagine.

Inizialmente, il software ha eseguito un appaiamento automatico degli spots presenti su due mappe a confronto e l'analisi è proseguita con il calcolo delle differenze quantitative tra spots presenti in entrambe le mappe. Gli spots con differenze di espressione pari al doppio in intensità sono stati considerati significativi e sottoposti a spettrometria di

massa.

Spettrometria di massa per l'identificazione delle proteine dopo elettroforesi bidimensionale

Gli spots selezionati sono stati excisi dal gel in condizioni di sterilità, immersi in acqua acidula (5% CH_3COOH) e sottoposti a digestione triptica, secondo quanto descritto da Bottino et al. (2003). Brevemente, la digestione è stata effettuata overnight a 37°C in un tampone contenente 100 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, 1 mM CaCl_2 a pH 8,9, 30% $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ e 5 μL di una soluzione di tripsina concentrata (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dopo centrifugazione, il supernatante è stato recuperato e portato a secco mediante una pompa a vuoto (Savant Instrument, Inc., Farmingdale, NY) per ridurre la concentrazione di $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ e, in seguito, sono stati aggiunti 30 μL di una soluzione allo 0,25% di HCOOH .

Le analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF (MatriX-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) sono state eseguite dal gruppo del Dott. Candiano presso l'Ospedale Gaslini di Genova, come descritto da Musante e collaboratori (Musante et al., 2006). In particolare, è stato utilizzato uno spettrometro di massa "LTQ linear trap" (Thermo Electron, San José, CA) associato ad un HPLC Surveyor (Thermo Electron). I peptidi sono stati eluiti dalla colonna utilizzando un gradiente di $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$.

I valori di massa dei peptidi ottenuti, insieme ad altri parametri quali il tipo di proteasi utilizzata per l'idrolisi, sono stati introdotti nel software SEQUEST (Thermo Electron) all'interno del "IPI Human protein database", per identificare le proteine di provenienza.

Separazione di proteine in funzione del loro pH

La separazione in base al punto isoelettrico in fase liquida delle proteine cellulari è stata ottenuta utilizzando l'apparato MicroRotofor (Bio-Rad).

In breve, le membrane a scambio ionico sono state dapprima equilibrate overnight con l'appropriata soluzione elettrolitica: all'anodo si utilizza una soluzione di 0,1 M NaOH mentre al catodo si utilizza una soluzione 0,1 M di H_3PO_4 , così da ottenere un intervallo di pH compreso tra 3 e 10 in cui separare il campione.

Il pellet cellulare, lavato due volte con una soluzione contenente 10 mM Tris-HCl , pH 7,4 e 250 mM saccarosio e successivamente solubilizzato in un tampone costituito da 7 M

UREA, 2 M Tiourea, 4% CHAPS e 1% DTT, è stato caricato nella camera centrale delle 10 di cui dispone lo strumento.

Per ogni condizione sperimentale sono stati sottoposti a separazione 2,5 µg di proteine e il volume di 2,5 ml, che corrisponde alla capienza delle camere, è stato raggiunto aggiungendo al campione il tampone precedentemente utilizzato per risospendere le proteine addizionato di 0,8% Anfoline pH 3-10 (Bio-Rad).

Le membrane sono state collegate agli elettrodi e, dopo assemblaggio della camera di “focusing”, l'IEF è stata eseguita alla potenza costante di 1 W con voltaggio variabile tra 100 e 350 V per circa 3 h. La successiva connessione con una pompa a vuoto ha consentito l'eluizione di 10 frazioni contenenti ognuna proteine con punto isolettrico in un range di pH pari a 0,7.

Le proteine presenti nelle 10 frazioni così ottenute sono state fatte precipitare in seguito all'aggiunta di 4 volumi di una soluzione di acetone: metanolo (12:1) e incubazione overnight a -20°C. I campioni sono stati quindi centrifugati a 10.000 rpm (Biofuge Fresco) per 15 min a 4°C e il pellet proteico è stato risospeso in tampone Laemmli e sottoposto a separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide al 7,5%, in condizioni denaturanti.

Il gel è stato trasferito su membrana di nitrocellulosa, a sua volta colorata con il colorante Ponceau (2 g/L Ponceau, 30 g/L acido tricloroacetico e 30 g/L acido sulfosalicilico).

Immunoprecipitazione di Vav1

Il pellet ottenuto da circa 10×10^6 cellule, dopo lavaggio con PBS addizionato di Na_3VO_4 , è stato risospeso in un tampone di lisi costituito da 50 mM Tris HCl, pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% sodio deossicolato, 150 mM NaCl e 1 mM EGTA, addizionato di inibitori delle proteasi (0,5 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina e 1 mM Na_3VO_4) e incubato 1 h a 4°C in agitatore rotante. Successivamente, il campione è stato sottoposto a centrifugazione in microfuge refrigerata a 14.000 rpm per 15 min (Biofuge Fresco) al fine di rimuovere il materiale non solubilizzato. I supernatanti sono stati incubati overnight a 4°C con l'anticorpo anti-Vav1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in agitatore rotante. Successivamente all'aggiunta di proteina A-Sefariosio (Pharmacia, Uppsala, S), i campioni sono stati nuovamente incubati per 1 h e 30 min a 4°C in agitatore rotante, quindi centrifugati per 5 min a 4.500 rpm (Megafuge 2.0 R), allo scopo

di far sedimentare gli immunocomplessi costituiti dalla molecola in esame, dall'anticorpo diretto contro di essa e dalla proteina A legata al Sefarosio e associata all'anticorpo.

Vav1 è stato immunoprecipitato anche dalle 10 frazioni ottenute mediante IEF in fase liquida, mediante incubazione con l'anticorpo specifico seguita da aggiunta di proteina A-Sefarosio.

Gli immunoprecipitati sono stati successivamente lavati per tre volte con PBS addizionato degli inibitori delle proteasi, centrifugati a 4.500 rpm per 5 min (Megafuge 2.0 R) ed infine risospesi in tampone Laemmli e sottoposti a separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide al 7,5%, in condizioni denaturanti. Dopo migrazione, le proteine sono state evidenziate mediante colorazione del gel con Blu Coomassie colloidale, come sopra riportato.

Spettrometria di massa per l'identificazione delle tirosine fosforilate di Vav1

Le bande corrispondenti alla proteina Vav1 immunoprecipitata sia da lisato cellulare totale che dalle frazioni ottenute mediante MicroRotofor sono state excise dal gel e sottoposte a spettrometria di massa (Laboratorio di Proteomica del Prof. Urbani della Fondazione Santa Lucia di Roma). In particolare, i frammenti di gel sono stati decolorati e le proteine in essi contenute sono state ridotte e alchilate usando una soluzione di DTT 10 mM e iodoacetamide 55 mM, quindi sottoposte a digestione con un gradiente di tripsina (Promega, Madison, WI) a 37°C. Dopo incubazione overnight, gli spettri di massa sono stati acquisiti con lo spettrometro Ultraflex III MALDI TOF/TOF (Bruker-Daltonics, Bremen, D) e processati usando il software FlexAnalysis (Bruker Daltonics). La ricerca in database è stata eseguita con l'algoritmo MASCOT_2.2.03 (www.matrixscience.com) consultando il database NCBI nr_20080912 e restringendo la ricerca al gruppo *Homo sapiens* (216740 sequenze).

Mutagenesi sito-specifica

Grazie alla tecnica di mutagenesi sito-specifica, le triplette codificanti per i quattro residui tirosinici 672, 711, 727, 745 presenti nel dominio SH2 della proteina Vav1 umana sono state selettivamente mutate nelle triplette codificanti per l'aminoacido fenilalanina. Le mutazioni sono state effettuate nel plasmide pEF Vav-myc contenente l'intera sequenza codificante per Vav1 umano fusa con una sequenza codificante per

un frammento della proteina myc (Dott.ssa Germani, ICGM-Hopital Cochin-Inserm, Parigi, F, utilizzando il kit QuickChange XL II site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) seguendo le istruzioni del fornitore.

In particolare, sono state utilizzate le seguenti coppie di primers: primer I (5'- CTG TTC ATC TCT GGT TCG CAG GCC CCA TGG AG -3') e primer II (5'-CTC CAT GGG GCC TGC GAA CCA GAG ATG AAC AG -3') per ottenere la mutazione Y672F; primer III (5'-GCC ATC AGC ATT AAA TTT AAC GTC GAG GTC AAG CAC -3') e primer IV (5'-GTG CTT GAC CTC GAC GTT AAA TTT AAT GCT GAT GGC-3') per produrre la mutazione Y711F; primer V (5'-CAG CAG AAG GAC TGT TCC GGA TCA CAG AGA AAA AG- 3') e primer VI (5'-CTT TTT CTC TGT GAT CCG GAA CAG TCC TTC TGC TG-3') per la mutazione Y727F ed infine il primer VII (5'- GGA GCT GGT GGA GTT TTT CCA GCA GAA CTC TC-3') e il primer VIII (5'- GAG AGT TCT GCT GGA AAA ACT CCA CCA GCT CC- 3') per generare la mutazione Y745F. Tutte le mutazioni sono state verificate sequenziando il DNA.

Cellule XL 10-Gold ultracompetenti (Stratagene) sono state trasformate con vettori mutati. Per isolare una grande quantità di DNA plasmidico è stato utilizzato il kit PureYield Plasmid Maxiprep System (Promega) seguendo le istruzioni del fornitore.

La realizzazione dei costrutti è stata effettuata in collaborazione con il Dott. Bavelloni del Laboratorio di Biologia Cellulare e Microscopia Elettronica degli Istituti Ortopedici Rizzoli di Bologna.

Over-espressione delle forme mutate in tirosina della proteina Vav1

Allo scopo di stabilire un'eventuale ruolo nel processo maturativo dei residui tirosinici di Vav1 in esame, le cellule HL-60 e NB4 sono state transfettate in modo transiente con i 4 costrutti plasmidici contenenti il gene umano di Vav1 mutato nelle triplette codificanti per le tirosine 672, 711, 727 e 745, rispettivamente. Per la procedura di transfezione, 5×10^6 cellule, a 24 h dalla semina, sono state diluite in 400 μ l di RPMI-1640 addizionato di 20% FBS, trasferite in cuvetta per elettroporazione (4MM Cuvette W/IN, Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories) e aggiunte di 10 μ g di DNA risospeso in soluzione TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 e 1mM EDTA). Per individuare le cellule over-esprimenti Vav1 mutato, la transfezione è avvenuta incubando le cellule con una miscela di DNA costituita da 9 parti di un costrutto codificante per Vav1 mutato e da 1 parte di un

costrutto codificante per la proteina fluorescente EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). L'elettroporazione è avvenuta come sopra descritto per la procedura di silenziamento, dopodichè le cellule sono state risospese in 8 ml di terreno RPMI-1640 addizionato di 20% FBS. Dopo 5 h di coltura a 37°C in 6% CO₂, le cellule sono state raccolte, centrifugate e risospese in terreno di coltura fresco addizionato di 10% FBS e trattate con 1 µM ATRA per 72 h. Le cellule over-esprimenti i diversi costrutti sono state quindi sottoposte ad analisi immunochimica e ad analisi citofluorimetrica dell'antigene di superficie CD11b, nonché a saggi di migrazione, per valutare il livello di differenziamento granulocitario raggiunto.

Saggio di migrazione cellulare

Per analizzare la capacità di migrazione cellulare sono state utilizzate piastre da 24 pozzetti dotate di inserti che includono una membrana di policarbonato del diametro di 6,5 mm, con pori della dimensione di 8 µm (Costar, Boddenheim, D).

In particolare, 2x10⁵ cellule, risospese in 100 µl di RPMI-1640 addizionato di 2% FBS, sono state collocate sull'inserto così da poter attraversare la membrana e raggiungere il compartimento inferiore della camera di migrazione in seguito all'azione chemioattraente di 600 µl di terreno addizionato di 25% di FBS. Dopo 6 h di incubazione, sia le cellule nel comparto superiore che quelle migrate nella camera inferiore sono state rimosse e contate mediante l'utilizzo di un emocitometro.

Per quanto riguarda le cellule sottoposte a transfezione, la percentuale di cellule verdi, over-esprimenti i costrutti mutati di Vav1, presenti nelle sospensioni cellulari delle camere superiore ed inferiore, è stata determinata mediante citometria a flusso.

Analisi immunochimica

Dopo separazione elettroforetica monodimensionale di lisati cellulari ed immunoprecipitati, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Hybond-C, Amersham Life Science, Little Chalfont, UK).

Per la rilevazione dei residui fosforilati delle tirosine è stato utilizzato l'anticorpo anti P-Tyr. La procedura prevede la saturazione della membrana di nitrocellulosa per 1 h con una soluzione di TBS 1X contenente il 3% di BSA. La membrana viene quindi fatta reagire con l'anticorpo primario (PY20, Transduction Laboratories, Lexington, KY)

diluito 1:1000 in TBS, 1% Tween-20 e 0,1% BSA, per 2 h. Trascorso tale intervallo di tempo, si eseguono tre lavaggi da 5 min con TBS contenente lo 0,05% di Tween-20. Si procede infine con l'incubazione con l'anticorpo secondario diluito 1:2000 in una soluzione di TBS contenente 0,1% Tween-20 e 0,1% BSA per 45 min.

Per quanto riguarda l'immunorilevazione delle proteine Vav1, 14-3-3 ϵ , α -enolase e p-Vav174 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e p160Vav (Abcam Ltd, Cambridge, UK), la procedura prevede l'incubazione della membrana per 1 h con una soluzione di TBS contenente 0,05% Tween-20 e 5% latte, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifici, e la successiva incubazione "overnight" con l'anticorpo primario diluito 1:1000. La membrana, dopo opportuni lavaggi con TBS addizionato di 0,05% di Tween-20, viene quindi incubata con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi alla diluizione di 1:2000.

Per verificare l'uguaglianza di carica proteica, le membrane sono state analizzate per il contenuto di β -tubulina. La procedura prevede l'incubazione della membrana di nitrocellulosa per 1 h con una soluzione di PBS contenente 3% BSA, seguita da 2 h di incubazione con l'anticorpo primario diluito 1:1000 e, dopo opportuni lavaggi con PBS contenente lo 0,1% di Tween-20, l'incubazione con l'adeguato anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi. La medesima procedura è stata utilizzata per l'immunorivelazione dell'actina e dell' α -tubulina.

Il complesso proteina/anticorpo-primario/anticorpo-secondario viene infine rilevato mediante l'utilizzo di un sistema chemiluminescente (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA) e autoradiografia su lastra (Kodak X-Omat AR Film).

Le lastre sono state acquisite mediante densitometro Agfa Duoscan T1200 (Agfa Graphics s.r.l., Milano, I) e l'analisi densitometrica degli autoradiogrammi è stata eseguita utilizzando il programma ImageQuant TL program (Amersham Bioscience, Uppsala, S).

Per rendere le membrane di nitrocellulosa disponibili a successive reazioni con i diversi anticorpi è stato necessario asportare il complesso anticorpo primario/anticorpo secondario mediante incubazione a 50°C per 10 min con una soluzione di "stripping" costituita da 100 mM β -mercaptoetanololo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 e 2% SDS, seguita da lavaggio in TBS contenente lo 0,1% di Tween-20 per 10 min.

Analisi statistiche

I risultati sono stati espressi come media di tre o più esperimenti \pm la deviazione standard, che in genere non superava il 10%.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Vav1 modula l'espressione proteica durante il differenziamento ATRA-indotto dei promielociti tumorali APL-derivati

Il modello sperimentale sul quale sono stati effettuati gli esperimenti riportati in questa tesi è costituito da cellule HL-60 e NB4 indotte a differenziare in presenza di 1 μ M ATRA per 4 giorni. Un primo gruppo di esperimenti ha avuto lo scopo di stabilire se Vav1 sia coinvolto nella regolazione del pool proteico attraverso il quale l'ATRA completa il processo maturativo di precursori APL-derivati. E' stata pertanto condotta un'analisi proteomica di cellule HL-60 e NB4 indotte a differenziare in presenza di ridotta quantità o fosforilazione tirosinica della proteina.

Come dimostrato precedentemente dal nostro gruppo di ricerca, in seguito al trattamento con ATRA, in entrambe le linee cellulari, Vav1 aumenta in quantità e fosforilazione tirosinica (Fig. 13). La somministrazione di Picetannolo, inibitore farmacologico specifico per la tirosina chinasi Syk, durante il trattamento differenziante, riduce significativamente i livelli di fosforilazione della proteina (Fig.13).

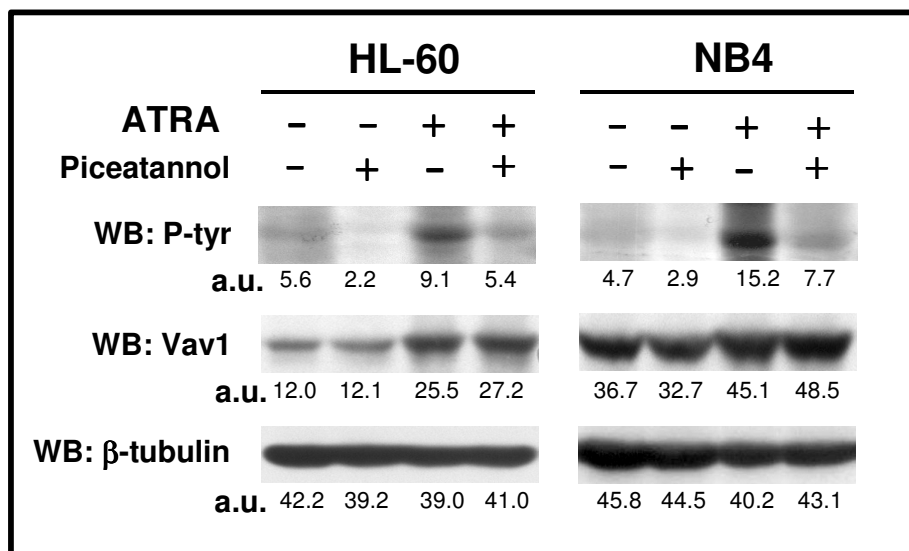


Figura 13. Lisati cellulari da cellule HL-60 e NB4 coltivate in presenza (+) o meno (-) di ATRA e/o Picetannolo sono stati sottoposti ad analisi immunochimica con gli anticorpi indicati. L'ibridazione con l'anticorpo anti- β -tubulina ha consentito di verificare l'equivalenza delle cariche proteiche. L'analisi densitometrica è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

L'aumento di Vav1 indotto dall'ATRA è stato contrastato mediante l'inibizione della traduzione del suo messaggero utilizzando la tecnica del siRNA. L'effettiva riduzione della proteina nel corso del trattamento differenziante è stata verificata, in entrambe le linee cellulari, mediante analisi immunochimica con l'anticorpo diretto contro Vav1 (Fig. 14).

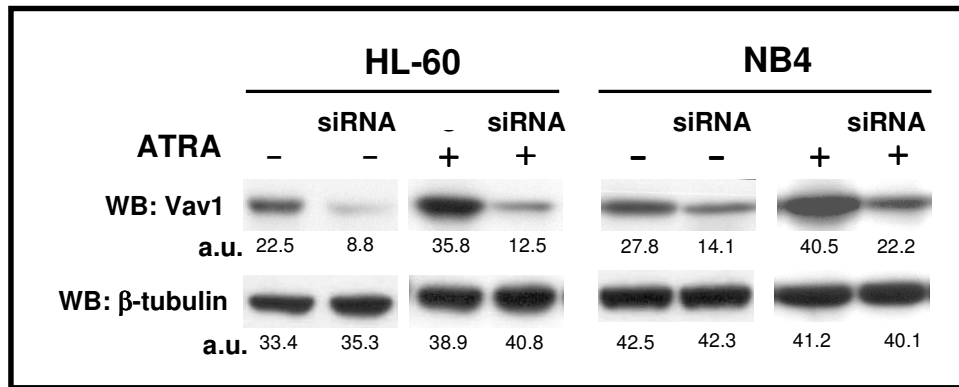


Figura 14. Lisati cellulari ottenuti da cellule HL-60 e NB4 soggette a down-modulazione dell'espressione di Vav1 (siRNA) coltivate in presenza (+) o meno (-) di ATRA sono stati sottoposti ad analisi immunochimica con gli anticorpi indicati. L'ibridazione con l'anticorpo anti- β -tubulina ha consentito di verificare l'equivalenza delle cariche proteiche. L'analisi densitometrica è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

L'analisi mediante citometria a flusso dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b ha consentito di valutare i livelli di differenziamento raggiunti da cellule nelle quali la quantità o la fosforilazione tirosinica di Vav1 sono state down-modulate (Fig. 15).

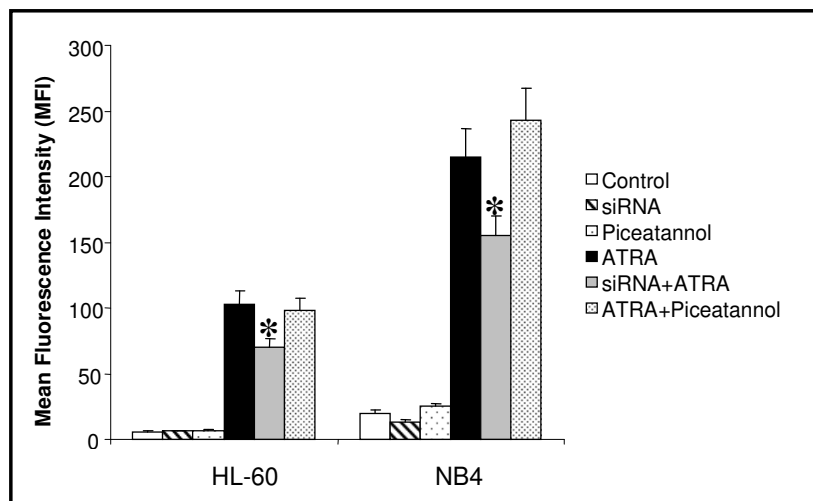


Figura 15. Valutazione citofluorimetrica dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b in cellule HL-60 e NB4 coltivate in condizione di controllo, sottoposte a down-modulazione dell'espressione (siRNA) o della fosforilazione (Piceatannol) di Vav1 nel corso del differenziamento con ATRA. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti. Gli asterischi rappresentano valori significativamente diversi.

Come atteso, il livello di differenziamento raggiunto da cellule indotte a maturare in presenza di una ridotta quantità di Vav1 è significativamente ridotto (Fig.15). Al contrario, la riduzione della fosforilazione tirosinica Syk-dipendente di Vav1 non incide significativamente sul livello di differenziamento granulocitario raggiunto da entrambe le linee cellulari (Fig. 15), confermando dati ottenuti precedentemente dal nostro gruppo di ricerca.

Allo scopo di stabilire se Vav1 è coinvolto nella modulazione dell'espressione del pool proteico ATRA-indotto, lisati cellulari nelle diverse condizioni sperimentali sono stati sottoposti ad elettroforesi bidimensionale ed analisi delle mappe proteiche, secondo quanto riportato nella sezione "Materiali e Metodi".

Negli esperimenti preliminari, per la realizzazione della focalizzazione isoelettrica delle proteine è stato utilizzato un intervallo di pH compreso fra 3 e 10. Poiché la maggior parte degli spots proteici era localizzata nella regione centrale di pH (dati non mostrati), gli esperimenti successivi e presentati in questa tesi sono stati compiuti usando un intervallo di pH, più ristretto, compreso tra 4 e 7.

All'isoelettrofocalizzazione è seguita la separazione elettroforetica e, dopo colorazione dei gels di poliacrilammide con Blu Coomassie colloidale, questi ultimi sono stati acquisiti mediante densitometro e le mappe proteiche così ottenute sono state valutate con un software dedicato (PDQuest), come descritto nella sezione "Materiali e Metodi".

Le Figure 16 ed 17 riportano, rispettivamente, un esempio di separazione bidimensionale di proteine da cellule HL-60 e NB4 differenziate con ATRA, in presenza di una ridotta quantità o fosforilazione tirosinica di Vav1.

In ogni gel, sono stati rintracciati fino a 500 spots dei quali, dopo normalizzazione e pulizia delle mappe, 350 sono stati sottoposti all'analisi mediante PDQuest. Gli spots selezionati, nelle diverse condizioni sperimentali, sono stati paragonati per individuare quelli corrispondenti a proteine la cui espressione mostrava un alto grado di variabilità (200% o più).

Dopo analisi di esperimenti multipli ($n = 3$), per ogni linea cellulare sono stati individuati 23 spots che comprendevano 3 proteine la cui espressione appariva costante e 20 la cui quantità si modificava significativamente nelle diverse condizioni sperimentali. Gli spots sono stati quindi prelevati dal gel, sottoposti a digestione triptica delle proteine e i peptidi così ottenuti sono stati analizzati mediante spettrometria di massa presso il laboratorio del Dr. Candiano all'ospedale Gaslini di Genova.

In seguito all'indagine con un programma specifico all'interno del database umano IPI,

sono stati identificate con certezza 12 proteine sia nelle cellule HL-60 (Fig. 16) che nelle cellule NB4 (Fig. 17). Di queste, per ogni linea cellulare, 3 corrispondevano alle proteine i cui spots apparivano di intensità costante e sono state identificate come actina (Fig. 16, 17, spot 1) calreticulina (Fig. 16, 17, spot 2), e cofilina-1 (Fig. 16, 17, spot 3).

Tutte le proteine identificate, insieme alle caratteristiche che ne hanno consentito l'identificazione e al loro ruolo funzionale, sono riportate in Tabella 3 e 4, rispettivamente per la linea cellulare HL-60 e NB4.

E' possibile osservare come nella linea cellulare HL-60, quando l'espressione di Vav1 è stata down-modulata durante il trattamento con ATRA, 5 proteine aumentano (Tabella 3 e Fig. 16, spots 4-8) e 4 diminuiscono (Tabella 3 e Fig. 16, spots 9-12) la loro espressione. Anche nella linea cellulare NB4 sono state identificate 5 proteine che aumentano la loro espressione (Tabella 4 e Fig. 17, spots 4, 6, 13-15) e 4 la cui quantità diminuisce (Tabella 4 e Fig. 17, spots 9, 12, 16, 17).

Quando la fosforilazione tirosinica Syk-dipendente di Vav1 è specificatamente inibita grazie alla somministrazione dell'inibitore farmacologico Picetannolo, solo una proteina, l' α -tubulina, appare down-modulata in entrambe le linee cellulari. E' interessante notare come l' α -tubulina appaia invece up-regolata quando l'espressione di Vav1 è ridotta mediante il silenziamento del suo messaggero (Tabelle 3, 4 e Fig. 16, 17, spot 6).

Questo suggerisce che la fosforilazione tirosinica Syk-dipendente di Vav1 non sia coinvolta nella modulazione *in toto* di proteine ma regoli più specificatamente l'espressione di proteine appartenenti al citoscheletro. Questo risultato supporta dati precedenti del nostro gruppo di ricerca che riportano come la fosforilazione tirosinica di Vav1 sia cruciale per ottenere le modifiche della morfologia nucleare che si verificano nel differenziamento ATRA-indotto di promielociti APL-derivati (Bertagnolo et al., 2001 b).

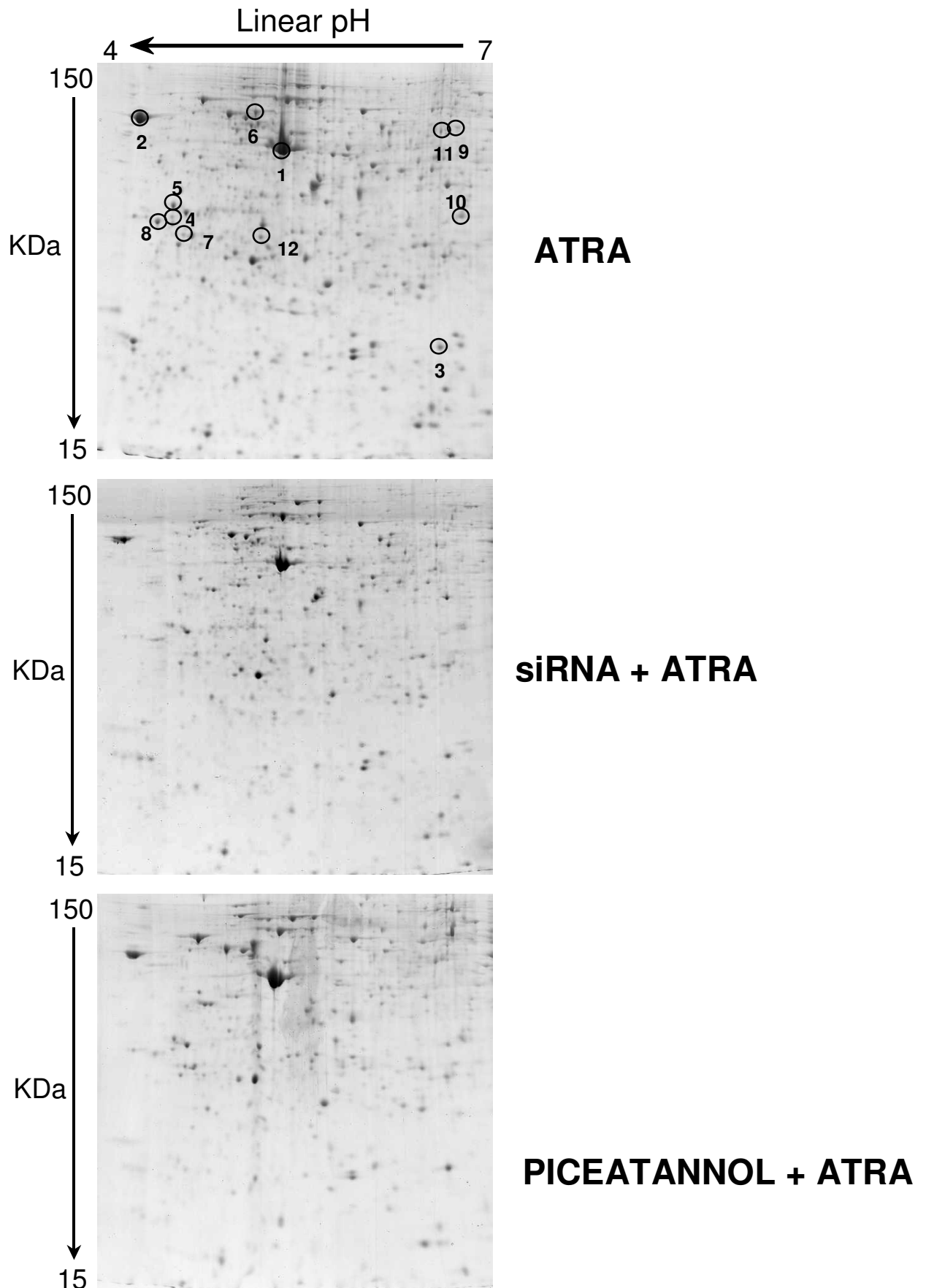


Figura 16. Elettroforesi bidimensionale di lisato totale di cellule HL-60 differenziate per 4 giorni con ATRA in condizioni di ridotta espressione (siRNA+ATRA) o fosforilazione tirosinica (Piceatannol+ATRA) di Vav1. Le proteine sono state separate nella prima dimensione secondo il gradiente di pH 4-7. La seconda dimensione ha consentito di separare proteine di peso molecolare compreso tra 15 e 150 KDa. Le mappe sono rappresentative di 3 esperimenti.

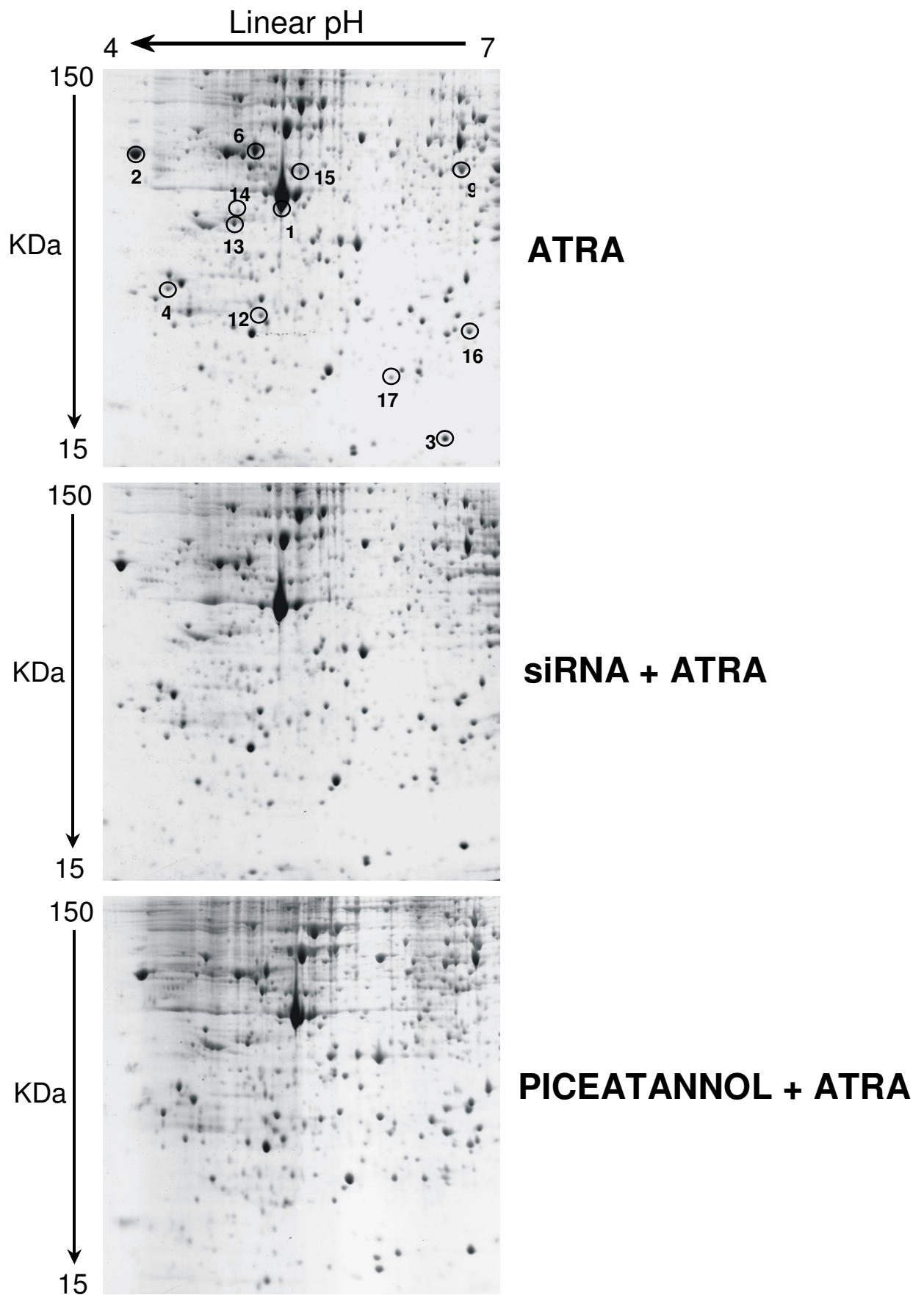


Figura 17. Elettroforesi bidimensionale di lisato totale di cellule NB4 differenziate per 4 giorni con ATRA in condizioni di ridotta espressione (siRNA+ATRA) o fosforilazione tirosinica (Piceatannol+ATRA) di Vav1. Le proteine sono state separate nella prima dimensione secondo il gradiente di pH 4-7. La seconda dimensione ha consentito di separare proteine di peso molecolare compreso tra 15 e 150 KDa. Le mappe sono rappresentative di 3 esperimenti.

Come riportato nelle Tabelle 3 e 4, in base al loro ruolo funzionale principale le proteine identificate includono enzimi, proteine legate al ciclo cellulare e all'apoptosi, molecole coinvolte nella sintesi, folding e degradazione di proteine stesse e proteine del citoscheletro.

Tabella 3. Proteine diversamente espresse in cellule HL-60 in cui l'espressione o la fosforilazione tirosinica di Vav1 è stata down-regolata durante il trattamento con ATRA.

Conditions	Spot n°	Protein name	Swiss Prot. Accession N°	Score	Coverage (%)	Peptide probability	Peptide (Hits)	Function		
siRNA	Up	4	14-3-3 protein epsilon	P62258	166.39	44.70	2.30E-13	43	Cell cycle, apoptosis	
		5	Proliferating cell nuclear antigen	P12004	168.31	51.00	8.45E-11	46	Cell cycle, apoptosis	
		6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90E-11	41	Cell structure-cytoskeleton	
		7	Proteasome subunit alpha type 5	P28066	46.27	14.50	2.78E-05	9	Protein degradation	
		8	Elongation factor 1-beta	P24534	46.29	24.60	3.59E-11	34	Protein synthesis and folding	
	Down	9	Alpha-enolase	P06733	100.33	32.10	2.22E-15	34	Enzymes	
		10	Hypothetical protein FLJ25678	P00491	144.32	38.90	4.56E-10	34	Enzymes	
		11	Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	206.33	47.10	4.00E-11	51	Cell cycle, apoptosis	
		12	Splice Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type 3	P25788	30.20	12.60	1.53E-06	5	Protein degradation	
	Piceatannol	Down	6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90E-11	41	Cell structure-cytoskeleton

Tabella 4. Proteine diversamente espresse in cellule NB4 in cui l'espressione o la fosforilazione tirosinica di Vav1 è stata down-regolata durante il trattamento con ATRA.

Conditions	Spot n°	Protein name	Swiss Prot. Accession N°	Score	Coverage (%)	Peptide probability	Peptide (Hits)	Function		
siRNA	Up	4	14-3-3 protein epsilon	P62258	166.39	44.70	2.30E-13	43	Cell cycle, apoptosis	
		6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90E-11	41	Cell structure-cytoskeleton	
		13	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	O60812	72.25	20.50	4.90E-07	20	Protein synthesis and folding	
		14	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Q9Y3F4	150.32	42.90	4.19E-12	42	Enzymes	
		15	Eukaryotic initiation factor 4A-I	P60842	154.30	40.90	5.00E-09	55	Protein synthesis and folding	
	Down	9	Alpha-enolase	P06733	100.33	32.10	2.22E-15	34	Enzymes	
		12	Splice Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type 3	P25788	30.20	12.60	1.53E-06	5	Protein degradation	
		16	RcTPI1	Q2QD09 ^{a)}	96.26	24.10	3.76E-08	27	Enzymes	
		17	Splicing factor, arg/ser rich 3	P84103	40.16	18.90	4.55E-06	9	Protein synthesis and folding	
	Piceatannol	Down	6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90E-11	41	Cell structure-cytoskeleton

^{a)}Tremble accession number

L'espressione di alcune proteine si modifica in entrambe le linee cellulari in seguito alla down-modulazione di Vav1 durante il differenziamento con ATRA. Queste proteine, riportate in Tabella 5 insieme al loro ruolo principale, sono la 14-3-3 ϵ (Fig. 16, 17, spot 4) e l' α -tubulina (Fig. 16, 17, spot 6), che aumentano la loro espressione e l' α -enolase (Fig. 16, 17, spot 9) e l'isoforma 2 della subunità α 3 del proteasoma (Fig. 16, 17, spot 12), i cui livelli di espressione diminuiscono.

Tabella 5. Proteine diversamente espresse sia nella linea cellulare HL-60 che NB4 quando l'espressione o la fosforilazione tirosinica di Vav1 è stata down-regolata durante il trattamento con ATRA.			
Conditions		Protein Name	Known function
siRNA	Up	14-3-3 protein epsilon Tubulin alpha-chain	Cell cycle, apoptosis Cell structure-cytoskeleton
	Down	Alpha-enolase Splice Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type 3	Enzymes Protein degradation
Piceatannol	Down	Tubulin alpha-chain	Cell structure-cytoskeleton

I risultati ottenuti mediante gli esperimenti di proteomica sono stati validati attraverso analisi immunochimica eseguita su cellule HL-60 e NB4 indotte a differenziare nelle medesime condizioni sperimentali. A tale scopo, tra le proteine identificate sono state selezionate quelle che variavano in entrambe le linee cellulari e per le quali esiste un anticorpo disponibile commercialmente. E' stata pertanto effettuata l'analisi immunochimica delle proteine 14-3-3 ϵ , α -enolase e α -tubulina.

Come riportato nella Figura 18, il trattamento con l'ATRA induce una debole riduzione di espressione della proteina 14-3-3 ϵ solo nella linea cellulare NB4, mentre determina un aumento nell'espressione dell' α -enolase in entrambe le linee cellulari. In presenza di livelli forzatamente ridotti di Vav1, rispetto alle quantità presenti nella condizione differenziata, i livelli della proteina 14-3-3 ϵ aumentano e quelli dell' α -enolase diminuiscono, così come era emerso dall'analisi delle mappe proteiche.

Come ulteriore controllo, sono stati analizzati i livelli di espressione dell'actina che, come riportato in Figura 18, aumentano in seguito al trattamento con ATRA ma non variano in seguito alla down-modulazione di Vav1, confermando ancora una volta i dati ottenuti dall'analisi delle mappe proteiche.

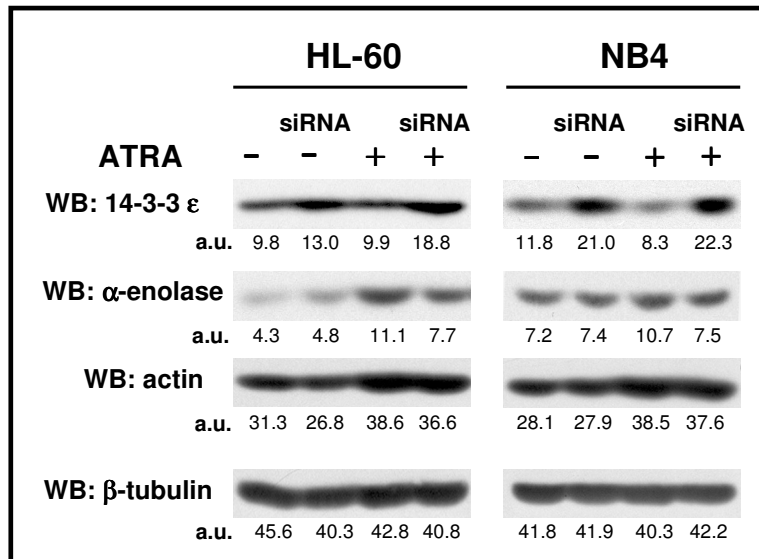


Figura 18. Analisi immunochimica con gli anticorpi indicati di lisati di cellule HL-60 e NB4 in cui è stata down-modulata l'espressione di Vav1 (siRNA) nel corso del trattamento differenziante. L'ibridazione con l'anticorpo anti- β -tubulina costituisce un marcatore dell'equivalenza delle cariche proteiche. L'analisi densitometrica è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

L'analisi immunochimica dell'espressione dell' α -tubulina condotta su lisati da cellule HL-60 e NB4 indotte a differenziare in presenza di ridotte quantità o ridotti livelli di fosforilazione tirosinica di Vav1 è riportata nelle Figure 19 e 20, rispettivamente.

I risultati indicano che, in entrambe le linee cellulari, l'ATRA induce un aumento di espressione dell' α -tubulina e, rispetto alle quantità presenti nella condizione differenziata, i livelli di espressione aumentano in seguito alla down-modulazione di Vav1 (Fig. 19) mentre diminuiscono in presenza di ridotti livelli di fosforilazione tirosinica (Fig. 20), confermando i dati su ottenuti mediante analisi bidimensionale e validando la correttezza dell'approccio proteomico da noi utilizzato.

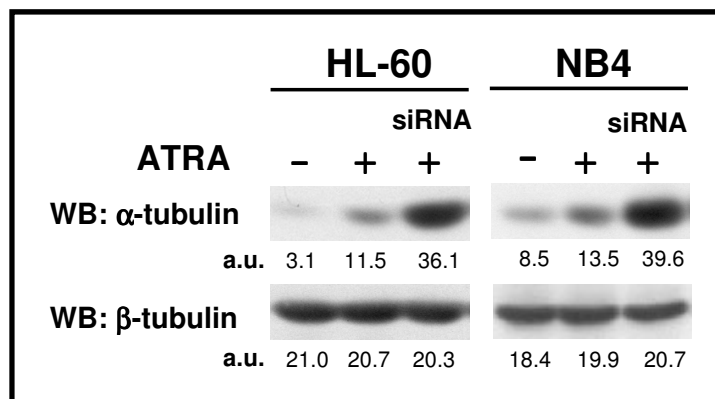


Figura 19. Lisati di cellule HL-60 e NB4 in cui è stata down-modulata l'espressione di Vav1 (siRNA) nel corso del trattamento differenziante sono stati sottoposti all'analisi immunochimica con l'anticorpo diretto contro l' α -tubulina. L'ibridazione con l'anticorpo anti- β -tubulina costituisce un marcatore dell'equivalenza delle cariche proteiche. L'analisi densitometrica è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti.

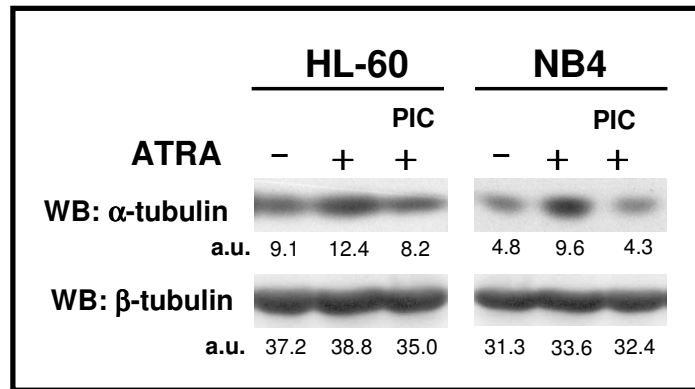


Figura 20. Lisati di cellule HL-60 e NB4 in cui è stata down-modulata la fosforilazione tirosinica di Vav1 (PIC) nel corso del trattamento differenziante sono stati sottoposti all'analisi immunochimica con l'anticorpo diretto contro l' α -tubulina. L'ibridazione con l'anticorpo anti- β -tubulina costituisce un marcatore dell'equivalenza delle cariche proteiche. L'analisi densitometrica è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

Come sopra riportato, alcune proteine ATRA-indotte risultano modulate in entrambe le linee cellulari HL-60 e NB4 quando la quantità o la fosforilazione tirosinica di Vav1 sono down-regolate nel corso del trattamento differenziante. Ciò suggerisce che queste potrebbero essere parte di un meccanismo comune nella maturazione ATRA-indotta di promielociti APL-derivati

Per quanto riguarda la proteina 14-3-3 ϵ , è noto dalla letteratura che il trattamento con ATRA ne induce la riduzione dei livelli di espressione nelle cellule NB4 e determina una più generale down-modulazione di altre isoforme della proteina in entrambe le linee cellulari HL-60 e NB4 (Harris et al., 2004). La 14-3-3 ϵ è una delle 7 isoforme di una famiglia di fosfoferin-proteine dimeriche che partecipano alla trasduzione del segnale in diversi eventi cellulari (Xing et al., 2000; Kjarland et al., 2006). E' noto, in particolare, che la famiglia delle proteine 14-3-3 può attivare alcune isoforme di PKC, a loro volta coinvolte nella regolazione delle caspasi (Van Der Hoeven et al., 2000; Tzivion et al., 2006). L'interazione diretta di specifiche isoforme di 14-3-3 con proteine pro-apoptotiche, finalizzata all'inibizione della loro attività, suggerisce per queste molecole un ruolo importante nella sopravvivenza cellulare (Porter et al., 2006).

Poiché le proteine 14-3-3 modulano numerosi pathways che risultano de-regolati nella tumorigenesi, un loro possibile ruolo nell'insorgenza di un fenotipo tumorale è stato ipotizzato (Martinez, 2005). A conferma di una sua possibile implicazione nella tumorigenesi, è stato recentemente dimostrato che l'espressione stabile di 14-3-3 ϵ nelle cellule da cancro al colon-retto protegge dall'apoptosi (Liou et al., 2007).

I dati da noi ottenuti nelle linee cellulari HL-60 e NB4 dimostrano che una ridotta espressione di Vav1 durante il trattamento con ATRA è accompagnata da un'aumentata espressione della isoforma ϵ di 14-3-3. Ciò suggerisce che la quantità di Vav1 possa essere critica nel modulare, attraverso la regolazione dei livelli di 14-3-3 ϵ , i processi apoptotici nelle cellule da leucemia promielocitica acuta.

Per quel che riguarda l' α -enolase, una proteina multifunzionale coinvolta nella glicolisi, questa è stata ritrovata nel siero di pazienti affetti da diverse neoplasie e sembra avere un ruolo nella tumorigenesi (Zou et al., 2005). In particolare, l' α -enolase è considerata un marker diagnostico per molti tumori (Pancholi, 2001) e la sua espressione durante il processo di maturazione cellulare è utilizzata come marcatore del differenziamento e nella stadiazione di diverse neoplasie tra cui la leucemia mieloide acuta, dove potrebbe contribuire all'evoluzione avversa della patologia (Lopez-Pedraza et al., 2006).

Nella leucemia promielocitica acuta, l' α -enolase mostra una leggera up-regolazione rispetto alle altre AML e l'indagine condotta sulle linee cellulari APL-derivate ha dimostrato che questa è una delle proteine la cui espressione aumenta in seguito al trattamento con ATRA (Wang et al., 2004). Ciò suggerisce che l' α -enolase, coinvolta nel metabolismo dei carboidrati, potrebbe provvedere all'energia per la sintesi delle proteine necessarie per il processo di differenziamento. La riduzione della sua espressione, da noi rilevata come conseguenza della down-modulazione di Vav1 durante il trattamento con ATRA, suggerisce che Vav1 possa sostenere il completamento del programma maturativo di promielociti APL-derivati anche attraverso la regolazione di pathways metabolici.

Come sopra riportato, in seguito alla down-modulazione di Vav1 nel corso del differenziamento ATRA-indotto delle linee cellulari HL-60 e NB4 è stata evidenziata anche una riduzione dell'espressione dell'isoforma 2 della subunità $\alpha 3$ del proteasoma. Poiché quest'ultimo è la più grande "macchina cellulare" responsabile della degradazione delle proteine (Von Mikecz, 2006), i risultati da noi ottenuti suggeriscono che Vav1, nel nostro modello sperimentale, potrebbe essere coinvolto nella regolazione del turnover proteico, modulando la composizione del proteasoma.

Per quel che riguarda l' α -tubulina, questa è una componente dei microtubuli, che forniscono segnali di posizione e sono necessari per stabilire la polarità in diversi tipi cellulari. E' noto che l'ATRA induce, sia in cellule HL-60 che NB4, la produzione di

sostanze chemioattraenti necessarie per la migrazione e l'eventuale apoptosi, ma nessun dato mostra il coinvolgimento dei microtubuli, e quindi dell' α -tubulina, in questo fenomeno (Olins et al., 2000; Veselská et al., 2003). Altri fenomeni correlati a modificazioni citoscheletriche, quali ad esempio la fagocitosi, potrebbero quindi richiedere l'aumento dell' α -tubulina indotto dall'ATRA durante il differenziamento di precursori mieloidi APL-derivati. Resta comunque difficile spiegare l'ulteriore aumento di proteina da noi osservato quando il differenziamento dei promielociti tumorali è condotto in presenza di ridotti livelli di Vav1.

La tirosina 745 di Vav1 è fosforilata durante il differenziamento ATRA-indotto di cellule NB4

Come sopra riportato, la fosforilazione tirosinica di Vav1 aumenta sostanzialmente dopo trattamento con ATRA sia nelle cellule HL-60 che nelle cellule NB4.

Un secondo gruppo di esperimenti è stato pertanto condotto allo scopo di individuare il/i residuo/i tirosinico/i di Vav1 fosforilato/i in seguito al trattamento differenziante e, auspicabilmente, di stabilirne un ruolo funzionale nel processo maturativo di precursori tumorali. Questa indagine è stata condotta sulla linea cellulare NB4 che, a differenza della linea cellulare HL-60, presenta tutte le caratteristiche dei blasti leucemici APL-derivati.

Allo scopo di ottenere miscele proteiche arricchite della proteina Vav1, lisati totali di cellule NB4 coltivate in condizioni di controllo e in presenza di ATRA sono stati sottoposti a IEF in fase liquida, secondo quanto riportato nella sezione "Materiali e Metodi". Le proteine contenute nelle 10 frazioni così ottenute sono state separate mediante elettroforesi monodimensionale e trasferite su membrana di nitrocellulosa.

La colorazione con Ponceau ha consentito di verificare la presenza di proteine in tutte le frazioni, anche se in quantità diversa e con una prevalenza delle proteine ad alto peso nelle frazioni più acide e delle proteine a peso relativamente più basso nelle frazioni più basiche (Fig. 21).

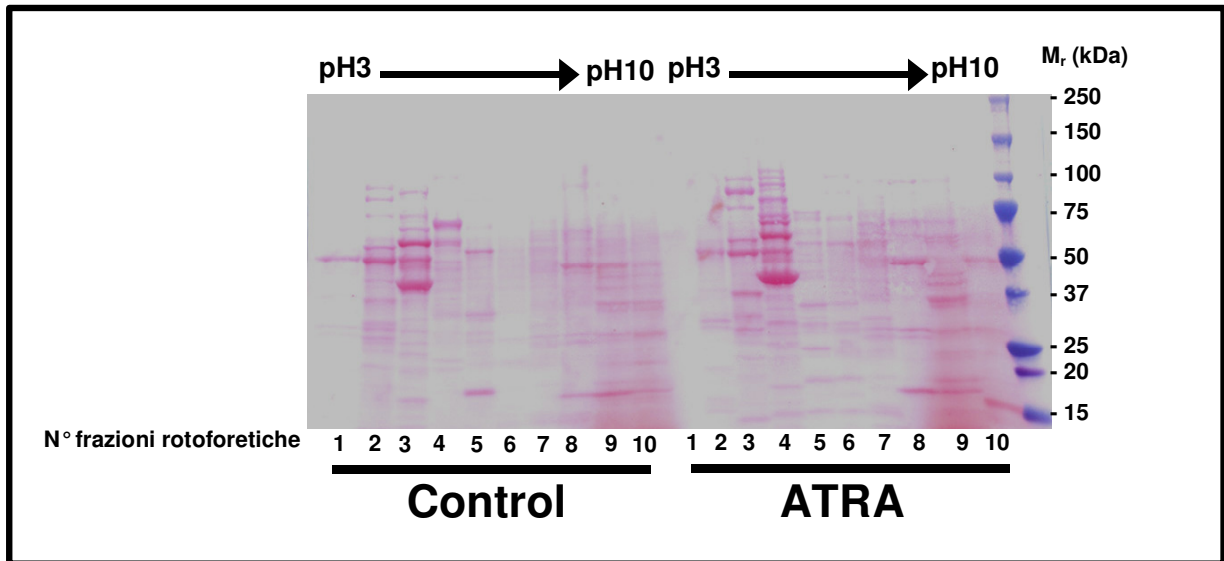


Figura 21. Colorazione mediante Ponceau della membrana di nitrocellulosa contenente le frazioni proteiche con diversi intervalli di pH ottenute dopo separazione rotoforetica di lisati da cellule NB4 di controllo e differenziate con ATRA. I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

La porzione di membrana di nitrocellulosa contenente Vav1, come dedotto dalla posizione delle proteine a peso molecolare noto migrate a lato, è stata fatta reagire con un anticorpo diretto specificamente contro Vav1. Come riportato in Figura 22, Vav1 è presente, sia nella condizione di controllo che differenziata, nelle frazioni 8, 9 e 10 (corrispondenti ad un pH compreso tra 7,9 e 10) risultando significativamente più abbondante nella frazione intermedia della condizione differenziata.

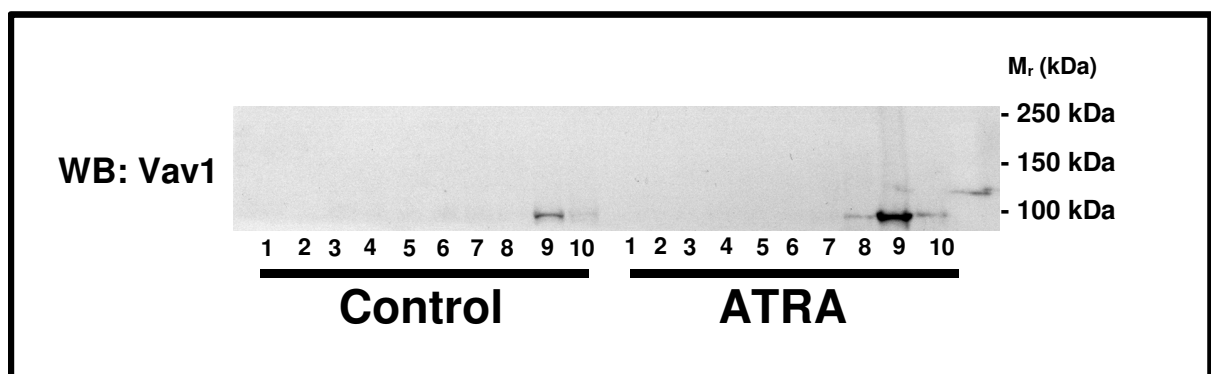


Figura 22. Analisi immunochimica eseguita con l'anticorpo anti-Vav1 delle frazioni proteiche a diversi intervalli di pH ottenute dopo separazione rotoforetica di lisati totali di cellule NB4 di controllo e differenziate (ATRA). I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

Una separazione elettroforetica maggiore delle proteine contenute nelle frazioni 8-10, arricchite di Vav1, seguita da analisi immunochimica con l'anticorpo specifico ha consentito l'identificazione di due bande con peso molecolare leggermente diverso, compatibile con due forme diversamente fosforilate della proteina (Fig. 23). Entrambe le bande aumentano d'intensità in seguito al trattamento con ATRA e la banda a maggior peso molecolare risulta quasi completamente localizzata nella frazione a pH maggiore (frazione 10, pH: 9,3-10).

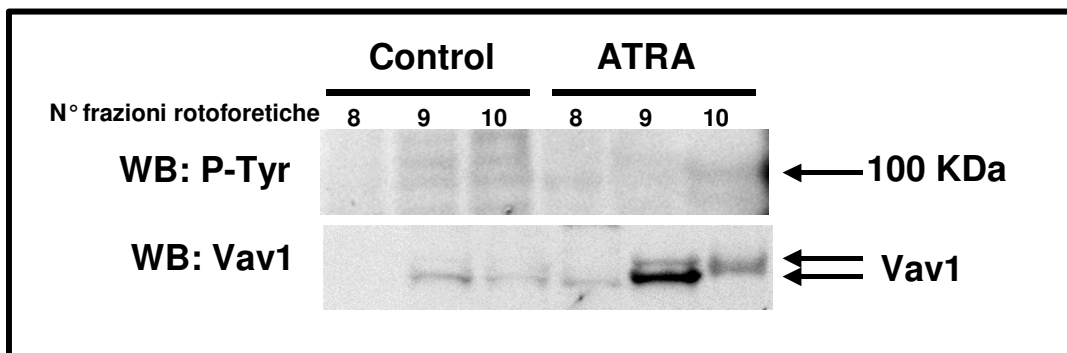


Figura 23. Analisi immunochimica, con gli anticorpi indicati, delle frazioni 8, 9 e 10 ottenute mediante separazione rotoforetica di lisati da cellule NB4 di controllo e indotte a differenziare con ATRA. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti.

L'ibridazione della stessa membrana con un anticorpo diretto specificamente contro i residui tirosinici fosforilati ha identificato una banda che co-migra con quella a più elevato peso molecolare tra le due riconosciute dall'anticorpo anti-Vav1 (Fig. 23), confermando che l'ATRA induce un aumento della fosforilazione tirosinica della proteina. Poiché la forma fosforilata di Vav1 è presente nelle frazioni allo stesso intervallo di pH nei lisati da cellule di controllo e differenziate, è plausibile dedurre che l'ATRA induce un aumento di fosforilazione di uno o più residui già fosforilati in condizioni basali.

Poiché dalla letteratura è noto che, in altri modelli sperimentali, Vav1 risulta fosforilato nelle tirosine corrispondenti ai residui 142, 160 e 174, le membrane di nitrocellulosa contenenti le 3 frazioni proteiche in esame sono state sottoposte ad analisi immunochimica con anticorpi specifici. In particolare, l'analisi è stata condotta con anticorpi diretti contro le tirosine 160 e 174, non essendo disponibile commercialmente, al tempo della redazione di questo esperimento, l'anticorpo diretto contro la tirosina 142.

Come dimostrato nella Figura 24, nessuna delle due bande a diverso peso molecolare riconosciute dall'anticorpo anti-Vav1 co-migra con la banda evidenziata dai due anticorpi anti-fosfotirosina utilizzati.

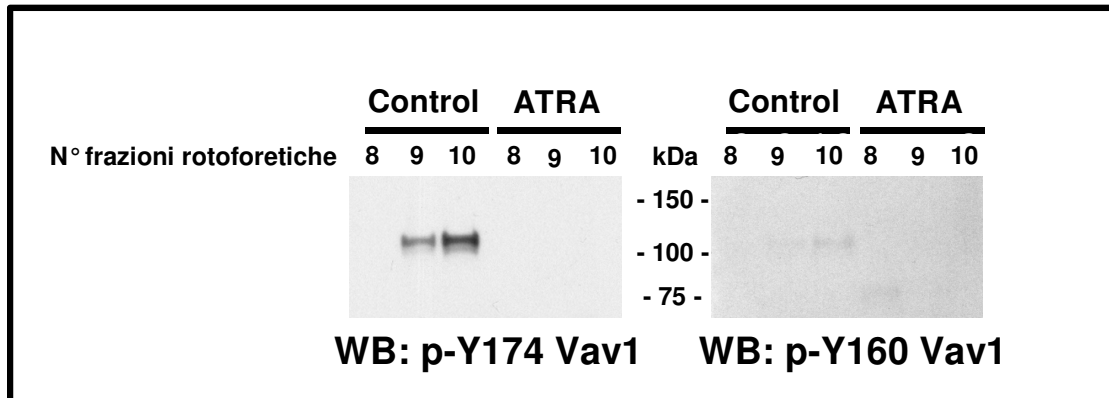


Figura 24. Analisi immunochimica delle frazioni 8, 9, 10 ottenute mediante separazione rotoforetica di cellule NB4 di controllo e differenziate (ATRA) con gli anticorpi diretti contro le tirosine 160 e 174 di Vav1. I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

Poiché l'utilizzo degli anticorpi commercialmente disponibili non ha consentito l'identificazione del/dei residuo/i tirosinico/i il cui livello di fosforilazione aumenta in seguito al trattamento differenziante con ATRA, l'indagine è proseguita con l'ausilio della spettrometria di massa.

In particolare, la proteina Vav1 è stata immunoprecipitata sia da lisati totali che dalle frazioni ottenute mediante IEF in fase liquida di cellule di controllo e differenziate.

Dopo separazione elettroforetica delle proteine, il gel di poliacrilammide è stato colorato con Coomassie Blu colloidale e la banda evidenziata, di peso molecolare corrispondente alla proteina Vav1, è stata asportata dal gel e sottoposta a digestione triptica e ad analisi mediante spettrometria di massa (eseguita presso il Laboratorio di Proteomica del Prof. Urbani della Fondazione S. Lucia di Roma).

Allo scopo di verificare che la banda evidenziata dal colorante corrispondesse alla proteina Vav1, una parte degli stessi immunoprecipitati, dopo separazione elettroforetica, è stata trasferita su membrana di nitrocellulosa e sottoposta ad analisi immunochimica con l'anticorpo anti-Vav1. Come riportato in Figura 25, la presenza di una sola banda del peso molecolare atteso (circa 97 kDa), più intensa nel campione costituito da cellule differenziate, conferma la specificità dell'anticorpo utilizzato.

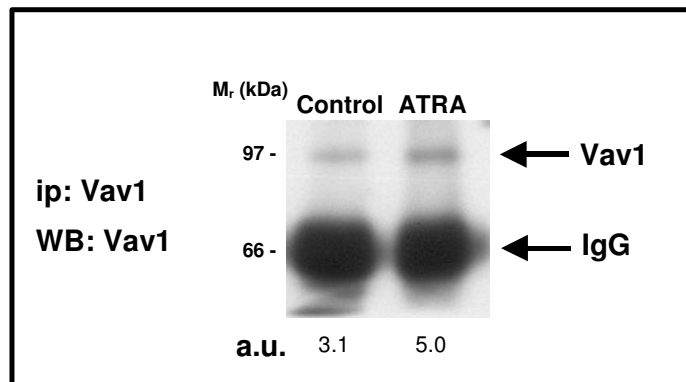


Figura 25. Analisi immunochimica della proteina Vav1 immunoprecipitata da cellule NB4 in condizioni di controllo e dopo differenziamento con ATRA. L'analisi densitometrica a cui sono stati sottoposti gli autoradiogrammi è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti.

Dei peptidi ottenuti in seguito a digestione triptica, la spettrometria di massa ha consentito di identificarne 25 per il campione controllo e 30 per il campione corrispondente alle cellule differenziate. Di questi, dopo analisi con software dedicato, 13 peptidi per ogni condizione sono risultati corrispondenti a sequenze aminoacidiche della proteina Vav1, costituendo, in entrambi i casi, il 25% della sequenza aminoacidica totale (Tabella 6).

Tabella 6. Identificazione mediante Peptide Mass Fingerprint della proteina Vav1.						
Sample	Identified protein by PMF	NCBI accession number	Mascot Score	Sequence coverage	Matching/searched Peptides	Theoretical M_r/pI
Control	Vav1	gi 119589464	90	25%	13/25	99,2 kDa/6,7
ATRA	Vav1	gi 119589464	84	25%	13/30	99,2 kDa/6,7

Tra i peptidi identificati, quello corrispondente alla sequenza aminoacidica GLTELVEFYQQNSLKDCFK corrisponde ad un picco presente in due diverse posizioni dello spettro di massa, sia nella condizione di controllo che differenziata (Fig. 26). La distanza tra i due picchi corrisponde a una differenza di massa di 80 Da, equivalente alla dimensione di un gruppo fosfato. Poiché all'interno del peptide in questione è

presente un residuo tirosinico, corrispondente all'aminoacido situato nella posizione 745 di Vav1, è plausibile ritenere che tale residuo risulti fosforilato nel nostro modello sperimentale. Lo stesso risultato è stato ottenuto in entrambe le condizioni di controllo e differenziata, suggerendo che l'ATRA non induca una fosforilazione *de novo* di Vav1 ma promuova un aumento dei livelli di fosforilazione di un residuo già parzialmente fosforilato in condizioni di controllo.

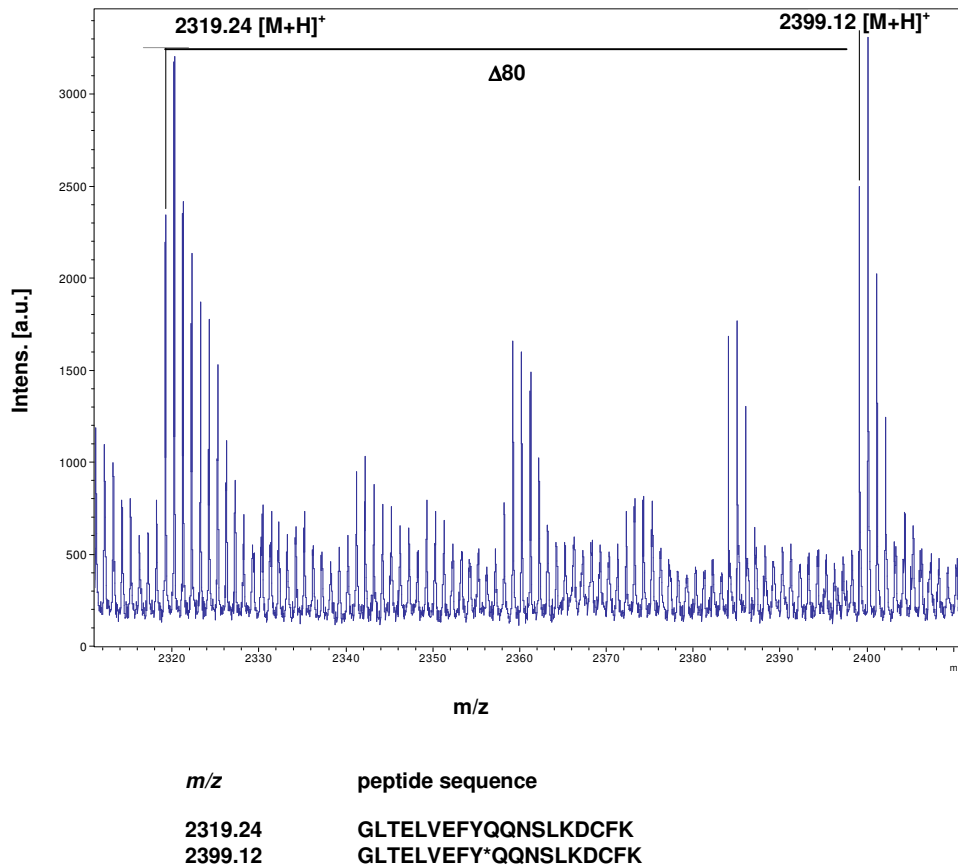


Figura 26. Porzione di spettro contenente i 2 picchi corrispondenti al peptide GLTELVEFYQQNSLKDFK. Un $\Delta m/z$ di 80 Da indica che i due peptidi differiscono per la presenza di un gruppo fosfato.

Nella Figura 27 è riportata l'intera sequenza aminoacidica della proteina Vav1 con l'indicazione dei peptidi identificati mediante spettrometria di massa. Con l'asterisco è indicata la tirosina corrispondente al residuo situato in posizione 745.

Sequence coverage of Vav1 identified in ATRA sample

```

1 MELWRQCTHWLIQCRVLPSPSHRVTWDGAQVCELAQALRDGVLLCQLLNNL
51 LPHAINLREVNLRPQMSQFLCKLNIRTFLLSTCCEKFGLKRSELFEAFDLF
101 DVQDFGKVIYTLALSWSWTPIAQNRGIMPFPTTEESVGDEDIYSGLSQDID
151 DTVEEDEDLYDCVENEEAEGDEIYEDLMRSEPVSMPPKMTEYDKRCCCLR
201 EIQQTEEKYDTLGSIQQHFLKPLQRFLKPDIEIIFINIEDLLRVHHTF
251 LKEMKEALGTPGAANLYQVFIKYKERFLVYGRYCSQVESASKHLDRVAAA
301 REDVQMKLEECQRANNGRFTLRDLLMVPMPQRVLKYHLLLQELVKHTQEA
351 MEKENLRLALDAMRDLAQCNEVKRDNETLRQITNFQLSI ENLDQSLAHY
401 GRPKIDGELKITSVERRSKM DRYAFLLDKALLICKRRGDS YDLKDFVNLH
451 SFQVRDDSSG DRDNKKWSHMFLIEDQGAQGYELFFKTRELKKKWMEQFE
501 MAISNIYPENATANGHDFQMFSEETTSCACQMLLRGTFYQGYRCHRCR
551 ASAHKECLGRVPPCGRHGQDFPGTMKKDKLHRRRAQDKKRNELGLPKMEVF
601 QEYYGLPPPPGAIGPFLRLNPGDIVELTKAEAEQNWWEGRNTSTNEIGWF
651 PCNRVKPYVHGPPQDLSVHLWYAGPMERAGAESILANRSDGTFLVRQRVK
701 DAAEFAISIKYNVEVKHIKIMTAEGLYRITEKKAFRGLTELVIFY*QQNSL
751 KDCFKSLDRTLQFPFKEPEKRTISRPAVGSTKYFGTAKARYDFCARDRSE
801 LSLKEGDIILNKKGQQGWWRGEIYGRVGFPCQLRGGR LF

```

Sequence coverage of Vav1 identified in control sample

```

1 MELWRQCTHW LIQCRVLPSPS HRVTWDGAQV CELAQALRDG VLLCQLLNNL
51 LPHAINLREV NLRPQMSQFL CLKNIRTFLLS TCCEKFGLKR SELFEAFDLF
101 DVQDFGKVIY TLSALSWSWTP I AQNRGIMPFPTTEESVGDEDIYSGLSQDID
151 DTVEEDEDLY DCVENEEAEG DEIYEDLMRS EPVSMPPKMT EYDKRCCCLR
201 EIQQTEEKYDTLGSIQQHFLKPLQRFLKPDIEIIFINI EDLLRVHHTF
251 LKEMKEALGT PGAANLYQVF IKYKERFLVY GRYCSQVESA SKHLDRVAAA
301 REDVQMKLEE CSQRANNGRF TLRDLLMVPMP QRVLKYHLLL QELVKHTQEA
351 MEKENLRLAL DAMRDLAQC NEVKRDNETL RQITNFQLSI ENLDQSLAHY
401 GRPKIDGELK ITSVERRSKM DRYAFLLDKA LLICKRRGDS YDLKDFVNLH
451 SFQVRDDSSG DRDNKKWSHM FLLIEDQGAQ GYELFFKTRE LKKKWMEQFE
501 MAISNIYPEN ATANGHDFQM FSFEETTSC ACQMLLRGTF YQGYRCHRCR
551 ASAHKECLGR VPPCGRHGQD FPGTMKKDKL HRRRAQDKKRN ELGLPKMEVF
601 QEYYGLPPPP GAIGPFLRLN PGDIVELTKA EAEQNWWEGR NTSTNEIGWF
651 PCNRVKPYVH GPPQDLSVHL WYAGPMERAG AESILANRSD GTFLVRQRVK
701 DAAEFAISIK YNVEVKHIKI MTAEGLYRIT EKKAFRGLTELVIFY*QQNSL
751 KDCFKSLDRTLQFPFKEPEK RTISRPAVGS TKYFGTAKAR YDFCARDRSE
801 LSLKEGDIILNKKGQQGW WRGEIYGRVGFPCQLRGGR LF

```

Figura 27. Sequenza di Vav1 con riportati, in rosso, i peptidi identificati nelle condizioni di controllo e differenziata. Il peptide contenente il residuo Y745 è sottolineato e con l'asterisco è indicata la putativa fosfotirosina (Y*) corrispondente al residuo Y745.

Allo scopo di stabilire il ruolo della tirosina localizzata nella posizione 745 della sequenza aminoacidica di Vav1 nel differenziamento ATRA indotto delle cellule APL-derivate NB4, queste ultime sono state sottoposte a transfezione transiente con un costrutto contenente il gene di Vav1 mutato nella tripletta codificante per il residuo Y745.

Le cellule transfettate sono state sottoposte al trattamento con ATRA e ad analisi

immunochimica dell'espressione e del livello di fosforilazione tirosinica della proteina Vav1. Come riportato in Figura 28, l'espressione di Vav1 mutato in Y745 si mantiene per tutta la durata del trattamento con ATRA e, a differenza del Vav1 nativo, non è influenzata dal trattamento con l'agonista. L'analisi immunochimica effettuata con l'anticorpo diretto specificamente contro Vav1 ha permesso di identificare con chiarezza la proteina over-espressa, in quanto questa presenta un peso molecolare di poco superiore rispetto alla proteina nativa in quanto all'interno del plasmide utilizzato per la transfezione, un'estremità della sequenza codificante per Vav1 è associata ad una breve sequenza del gene codificante per la proteina myc.

Come riportato nella Figura 28, in seguito al trattamento con ATRA, la fosforilazione tirosinica del Vav1 nativo, come atteso, aumenta significativamente, mentre non si modifica il livello di fosforilazione della proteina mutata over-espressa.

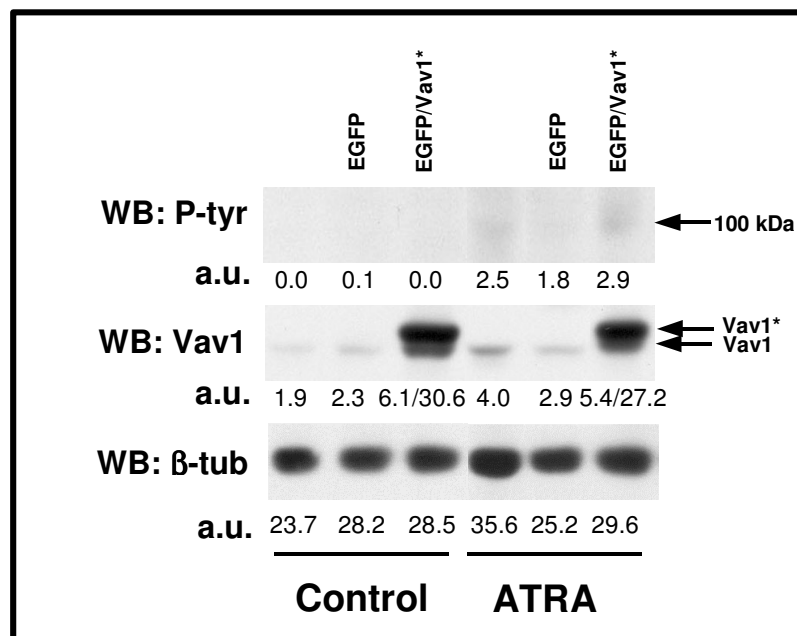


Figura 28. Analisi immunochimica, con gli anticorpi indicati, di cellule NB4 co-trasfettate con un costrutto contenente EGFP ed uno contenente il cDNA di Vav1 mutato nella tripletta codificante per il residuo Y745 (Vav1*) e indotte a differenziare con ATRA. L'ibridazione con l'anticorpo anti-β-tubulina costituisce un marcatore dell'equivalenza delle cariche proteiche. L'analisi densitometrica è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti.

Le cellule transfettate e sottoposte a trattamento differenziante sono state analizzate mediante citometria a flusso per valutare il loro livello di maturazione. La co-transfezione con la proteina fluorescente EGFP ha consentito di identificare le cellule

over-esprimenti in quanto in grado di emettere fluorescenza verde.

Solo le cellule verdi, esprimenti EGFP e Vav1 mutato, sono state sottoposte all'analisi dell'espressione del CD11b, a sua volta marcato con un fluorocromo in grado di emettere fluorescenza rossa (Fig. 29, quadrante 2).

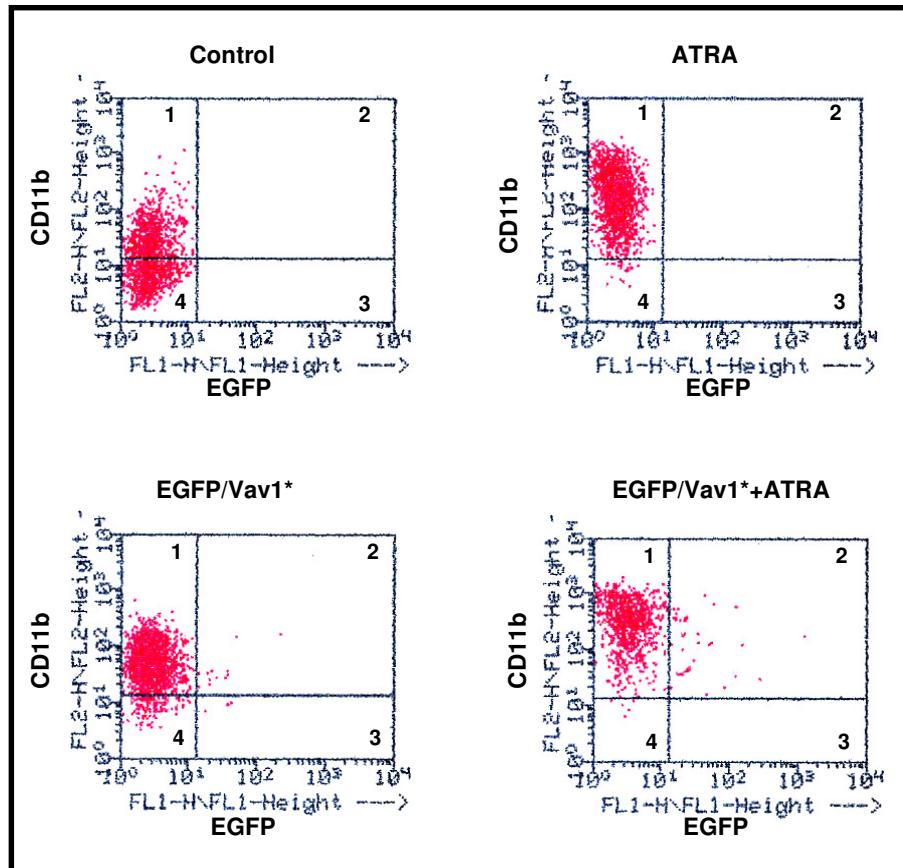


Figura 29. Analisi bi-parametrica su Dot-Plot di cellule NB4 co-trasfettate con un costrutto contenente EGFP ed uno contenente il cDNA di Vav1 mutato nella tripletta codificante per il residuo Y745 (Vav1*) e sottoposte a trattamento con ATRA. Ogni punto rappresenta un singolo evento acquisito dal citofluorimetro. I dati sono rappresentativi di 3 diversi esperimenti.

L'analisi delle cellule over-esprimenti solo EGFP, che costituivano il controllo del nostro esperimento, ha confermato che il trattamento con ATRA induce un aumento dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b (Fig. 30A).

L'analisi delle cellule over-esprimenti Vav1 mutato nella tirosina 745 dimostra come, in questa condizione sperimentale, il ruolo differenziante dell'ATRA sia contrastato. Il livello di espressione dell'antigene di superficie CD11b risulta infatti significativamente diminuito rispetto alla condizione di controllo costituita da cellule transfettate con la sola EGFP e sottoposte a trattamento con l'agonista (Fig. 30A).

Poiché il differenziamento granulocitario è associato all'acquisizione di capacità migratorie, le cellule NB4 over-esprimenti il costrutto mutato della proteina Vav1 sono state sottoposte a saggi di migrazione. E' stato possibile dimostrare che la mutazione nella tirosina 745 riduce significativamente la capacità dei promielociti tumorali di attraversare la membrana porosa in risposta al chemioattraente nel corso del processo maturativo indotto da ATRA (Fig. 30B).

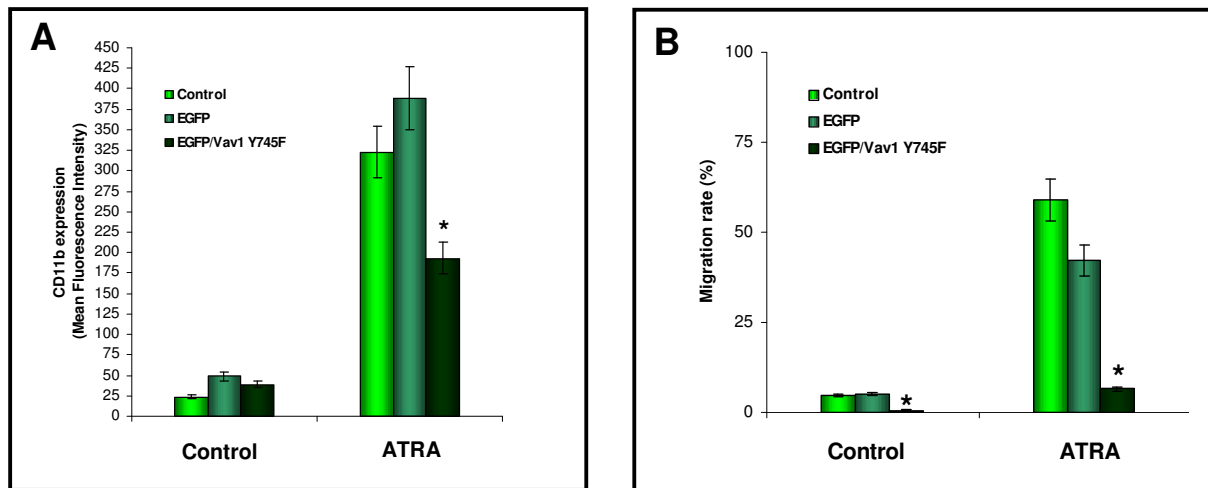


Figura 30. Analisi citofluorimetrica dell'espressione del marker di superficie CD11b (A) e della percentuale di migrazione attraverso membrana porosa (B) in cellule NB4 co-trasfettate con un costrutto contenente EGFP ed un plasmide contenente il cDNA di Vav1 mutato nella sequenza codificante per il residuo Y745, quindi coltivate in condizioni differenzianti. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti. SD \leq 10%. Gli asterischi rappresentano valori statisticamente significativi.

I dati ottenuti con questo gruppo di esperimenti indicano che il residuo tirosinico 745 di Vav1 è implicato nel completamento del programma differenziativo indotto da ATRA nelle cellule APL-derivate NB4.

Tale aminoacido, molto probabilmente, non costituisce un substrato della tirosina chinasi Syk, in quanto la sua mutazione nel corso del trattamento differenziante riduce l'espressione dell'antigene di superficie CD11b, contrariamente a quanto osservato in seguito all'inibizione specifica della fosforilazione Syk-dipendente di Vav1.

Poiché un ruolo funzionale per il residuo Y745 di Vav1 non è stato ancora descritto, la fosforilazione di questa tirosina, ad opera di una chinasi diversa da Syk, potrebbe essere alla base di un meccanismo attraverso il quale Vav1 svolge, in questo modello sperimentale, un ruolo alternativo a quello più noto di scambiatore guanositico.

Tirosine presenti nel dominio SH2 di Vav1 sono potenzialmente fosforilabili dalla tirosina chinasi Syk

Come precedentemente dimostrato dal nostro gruppo di ricerca, in seguito al trattamento con ATRA della linea cellulare HL-60, Vav1 associa, attraverso il proprio dominio SH2, con la tirosina chinasi Syk, dalla quale viene fosforilato. È stato inoltre dimostrato che l'inibizione specifica di Syk ad opera del Picetannolo nel corso del differenziamento granulocitario ATRA-dipendente delle linee cellulari HL-60 e NB4 non modifica significativamente l'espressione dell'antigene di superficie CD11b, ma impedisce le modificazioni della morfologia nucleare delle cellule differenzianti. Saggi di migrazione condotti su cellule HL-60 dimostrano come la riduzione della fosforilazione Syk-dipendente di Vav1 durante il trattamento differenziante riduce le capacità migratorie delle cellule stesse (Fig. 31). Questo risultato conferma l'ipotesi che tale fenomeno sia coinvolto nella riorganizzazione del citoscheletro, che, com'è noto, svolge un ruolo cruciale nella regolazione di morfologia e motilità cellulare.

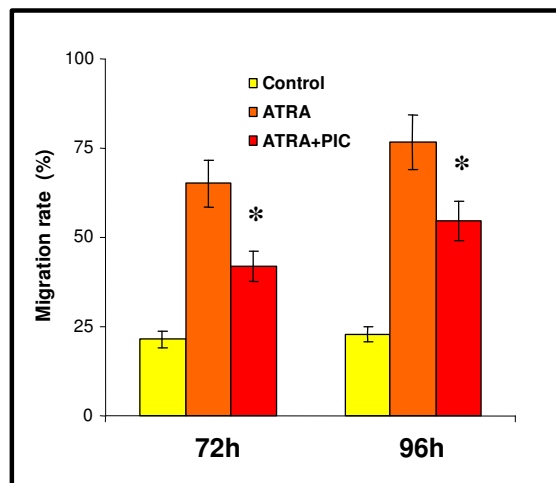


Figura 31. Cellule HL-60, coltivate in condizioni di controllo, in presenza di ATRA o sottoposte al trattamento con ATRA e Picetannolo (ATRA+PIC) per i tempi indicati, sono state sottoposte a saggi di migrazione cellulare attraverso membrana di policarbonato. I valori sono riportati sotto forma di percentuale di cellule migrate. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti. Gli asterischi rappresentano valori significativamente diversi.

Poiché la fosforilazione tirosinica di Vav1 svolge un ruolo importante nella regolazione dell'architettura delle cellule differenzianti, un terzo gruppo di esperimenti è stato eseguito allo scopo di identificare il/i residuo/i tirosinico/i della proteina possibile/i

substrato/i di Syk. L'indagine è stata compiuta utilizzando cellule HL-60 indotte a differenziare con ATRA, poiché è in questo modello sperimentale che l'interazione funzionale Syk/Vav1 è stata dimostrata.

Poiché l'associazione di Syk con Vav1 è mediata dal dominio SH2 di quest'ultima, nel quale sono presenti 4 residui tirosinici (Fig. 32), tali aminoacidi sono stati indagati come possibili substrati della chinasi.

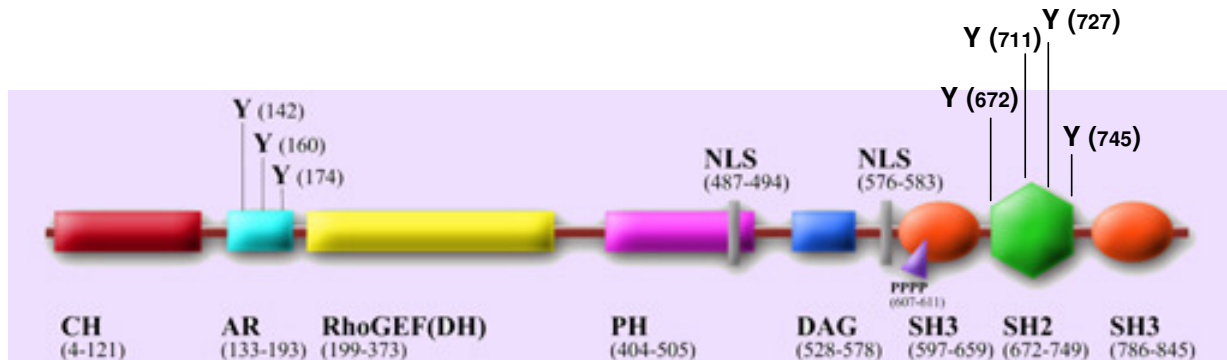


Figura 32. Rappresentazione schematica dei domini strutturali della proteina Vav1 con l'indicazione dei residui tirosinici presenti nella regione N-terminale (Y142, Y160 e Y174) e i residui presenti all'interno del dominio SH2 (Y672, Y711, Y727 e Y745).

A tale scopo, le triplette di basi codificanti per le tirosine in esame sul gene per Vav1 umano sono state sottoposte a mutagenesi sito-specifica. Le cellule HL-60 sono state quindi sottoposte a transfezione transiente con i plasmidi contenenti il gene umano di Vav1 mutato. Come riportato in Figura 33, già dopo 5 ore dalla transfezione, l'analisi immunochimica ha permesso di evidenziare l'over-espressione delle diverse forme mutate della proteina, che presentano un peso molecolare leggermente superiore rispetto alla proteina nativa, essendo fuse ad un'estremità con un frammento della proteina myc.

Le cellule over-esprimenti i diversi costrutti mutati di Vav1 sono state sottoposte a trattamento differenziante con ATRA e successiva analisi di caratteristiche associate al differenziamento, quali l'espressione dell'antigene di superficie CD11b e la capacità migratoria.

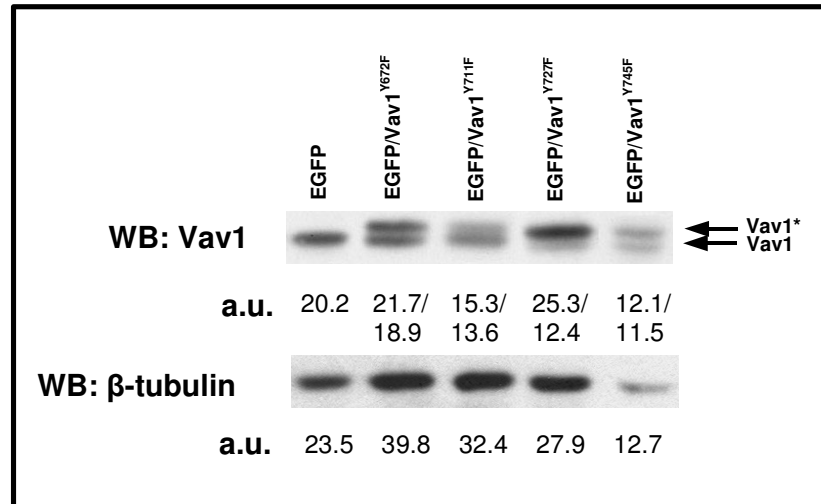


Figura 33. Analisi immunochimica effettuata con l'anticorpo diretto contro Vav1 di lisati da cellule HL-60 a 5 h dalla co-transfezione con un costrutto contenente EGFP e un plasmide contenente il cDNA di Vav1 mutato nella tripletta codificante per i residui Y672 (EGFP/Vav1^{Y672F}), Y711 (EGFP/Vav1^{Y711F}), Y727 (EGFP/Vav1^{Y727F}) e Y745 (EGFP/Vav1^{Y745F}), rispettivamente. L'asterisco indica la proteina Vav1 mutata. L'ibridazione con l'anticorpo anti-β-tubulina costituisce un marcatore dell'equivalenza delle cariche proteiche. L'analisi densitometrica è stata riportata sotto forma di unità arbitrarie (a.u.). I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti.

La co-transfezione dei singoli costrutti con uno codificante per la proteina fluorescente EGFP ha consentito di identificare, mediante citometria a flusso, le cellule over-esprimenti, sia in condizioni di controllo che differenziate, in quanto in grado di emettere fluorescenza verde (Fig. 34). Solo le cellule verdi, esprimenti EGFP e Vav1 mutato, sono state sottoposte all'analisi dell'espressione del CD11b, marcato con un fluorocromo in grado di emettere fluorescenza rossa (Fig. 34, quadrante 2).

L'analisi citofluorimetrica delle cellule over-esprimenti solo EGFP, che costituiscono il controllo del nostro esperimento, ha confermato innanzitutto che il trattamento con ATRA induce, come atteso, un aumento dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b (Fig. 35).

Le popolazioni cellulari over-esprimenti Vav1 mutato nei residui tirosinici 672, 711 e 727 non mostrano significative variazioni del livello di differenziamento raggiunto dopo trattamento con ATRA rispetto alle cellule transfettate con la sola EGFP (Fig. 35).

Per quanto riguarda, invece, le cellule HL-60 over-esprimenti la proteina Vav1 mutata nella tirosina 745, nel corso del trattamento differenziante con ATRA il livello di espressione dell'antigene di superficie CD11b è significativamente ridotto rispetto alle cellule over-esprimenti la sola proteina EGFP (Fig. 35).

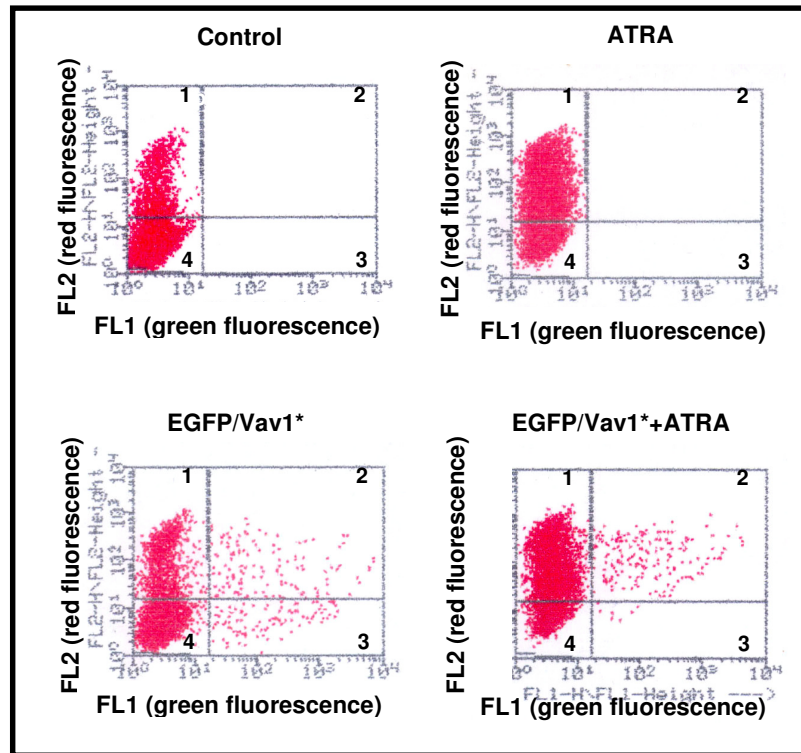


Figura 34. Analisi bi-parametrica su Dot-Plot di cellule HL-60 in condizioni di controllo o co-trasfettate con un costrutto codificante EGFP ed uno contenente il cDNA di Vav1 mutato nella tripletta codificante per un residuo tirosinico (EGFP/Vav1*) e sottoposte a trattamento differenziante con ATRA. Ogni punto rappresenta un singolo evento acquisito ed analizzato al citometro a flusso. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti.

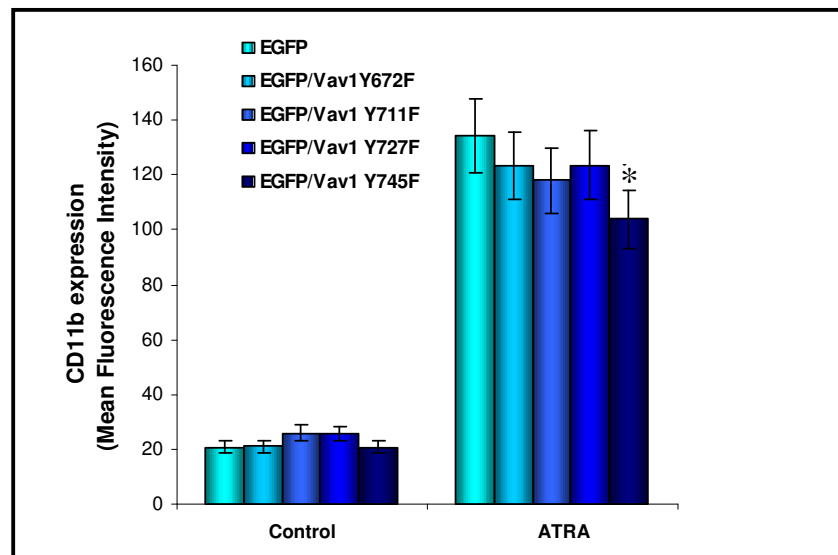


Figura 35. Analisi citofluorimetrica dell'espressione dell'antigene di superficie CD11b in cellule HL-60 co-trasfettate con un costrutto esprimente EGFP e un plasmide contenente il cDNA di Vav1 mutato nella sequenza codificante per i residui Y672 (EGFP/Vav1^{Y672F}), Y711 (EGFP/Vav1^{Y711F}), Y727 (EGFP/Vav1^{Y727F}) e Y745 (EGFP/Vav1^{Y745F}), rispettivamente, quindi coltivate in condizioni di controllo e differenzianti (ATRA). I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti. L'asterisco indica che il valore è significativamente diverso.

L'insieme di questi esperimenti suggerisce pertanto che il residuo tirosinico 745 presente nel dominio SH2 di Vav1 svolge un ruolo importante nella maturazione fenotipica indotta da ATRA nei promielociti tumorali HL-60, come già dimostrato nel paragrafo precedente nelle cellule NB4. Questo residuo, tuttavia, probabilmente non rappresenta un substrato della tirosina chinasi Syk dal momento che, a differenza della fosforilazione Syk dipendente di Vav1, influisce sull'espressione dell'antigene di superficie CD11b.

Dal momento che l'inibizione della fosforilazione Syk-dipendente di Vav1 riduce le capacità migratorie indotte dall'ATRA, sono stati effettuati saggi di migrazione su cellule HL-60 transfettate con i 4 costrutti codificanti per la proteina Vav1 mutata nelle tirosine Y672, Y711, Y727 e Y745, rispettivamente.

Le cellule migrate, sia nella condizione di controllo che differenziata, sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica, che ha consentito di identificare la popolazione cellulare verde over-esprime Vav1 mutato.

Il rapporto tra le cellule verdi migrate e quelle totali ha consentito di dimostrare che la mutazione dei residui tirosinici 727 e 745 non induce alcuna modifica nelle capacità migratorie delle cellule differenzianti (Fig. 36).

E' stato possibile evidenziare invece che la mutazione dei residui Y672 e Y711 incide significativamente sulla velocità di migrazione delle cellule HL-60 nel corso del trattamento differenziante con ATRA (Fig. 36).

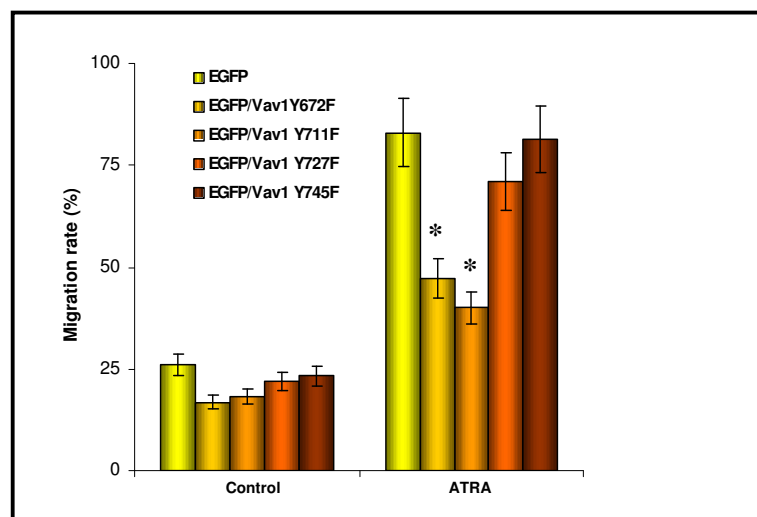


Figura 36. Analisi della percentuale di migrazione attraverso membrana di policarbonato di cellule HL-60 co-trasfettate con un costrutto esprimente EGFP e un plasmide contenente il cDNA di Vav1 mutato nelle sequenze codificanti per i residui Y672 (EGFP/Vav1^{Y672F}), Y711 (EGFP/Vav1^{Y711F}), Y727 (EGFP/Vav1^{Y727F}) e Y745 (EGFP/Vav1^{Y745F}), rispettivamente, quindi coltivate in condizioni di controllo e differenzianti. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti. Gli asterischi rappresentano valori significativamente diversi.

Le evidenze sperimentali riportate in questo ultimo gruppo di esperimenti suggeriscono quindi che le tirosine 672 e 711, localizzate nel dominio SH2 della proteina Vav1, potrebbero rappresentare possibili substrati della tirosina chinasi Syk in quanto la loro mutazione, come l'inibizione dell'attività tirosina chinasi di Syk, non ha effetti sull'espressione dell'antigene di superficie CD11b, ma è necessaria per la modulazione delle capacità migratorie nel corso del differenziamento granulocitario ATRA-dipendente di precursori mieloidi tumorali.

CONCLUSIONI

Il lavoro riportato in questa tesi si inserisce in un filone di ricerca che ha in precedenza chiarito diversi aspetti concernenti la distribuzione e il ruolo funzionale di Vav1 nel corso del differenziamento granulocitario di precursori normali e tumorali.

In cellule APL-derivate indotte a differenziare lungo la filiera granulocitaria mediante trattamento con ATRA, Vav1 aumenta in quantità e livelli di fosforilazione tirosinica, sia nella cellula *in toto* che nel compartimento nucleare. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che Vav1 non solo è essenziale per il processo differenziativo ATRA-indotto di precursori mieloidi tumorali ma ne induce un parziale differenziamento in senso granulocitario ed è coinvolto nella regolazione dell'espressione di geni attivati da ATRA nel corso del processo maturativo. E' stato inoltre dimostrato che la fosforilazione Syk-dipendente di Vav1 sembra svolgere un ruolo specifico nella regolazione della morfologia delle cellule differenzianti.

Partendo da queste evidenze, la ricerca condotta ha dapprima cercato di stabilire se Vav1 avesse un ruolo nel regolare il pool proteico attraverso il quale l'ATRA completa il processo maturativo di precursori APL-derivati. A tale scopo, è stata condotta un'indagine proteomica su linee cellulari APL-derivate indotte a differenziare lungo la filiera granulocitaria con ATRA. In particolare, lisati provenienti da cellule HL-60 e NB4 in cui è stata down-regolata la quantità o la fosforilazione tirosinica di Vav1 sono stati sottoposti a elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa.

Dai risultati ottenuti è emerso che la down-modulazione della quantità di Vav1 durante il trattamento con ATRA è responsabile della modulazione dell'espressione di proteine ATRA-indotte. Alcune di queste, tra cui 14-3-3 ϵ , α -enolase e l'isoforma 2 della subunità α 3 del proteasoma, sono modulate in entrambe le linee cellulari, suggerendo la loro partecipazione ad un meccanismo comune nella maturazione ATRA-dipendente di promielociti tumorali APL-derivati.

Dalla letteratura è noto che le proteine della famiglia 14-3-3, compresa l'isoforma ϵ , risultano variamente implicate nei meccanismi di controllo dell'apoptosi cellulare. Poiché, nel nostro modello sperimentale, l'espressione di 14-3-3 ϵ è up-regolata in seguito alla down-modulazione di Vav1, la quantità di quest'ultimo potrebbe, attraverso la regolazione dei livelli di 14-3-3 ϵ , modulare i processi apoptotici delle cellule APL-derivate.

Per quanto riguarda l' α -enolase, questa è un enzima glicolitico che sembra svolgere un ruolo in diversi processi fisio-patologici. Poiché dalla letteratura è noto che i suoi livelli aumentano in seguito al trattamento con ATRA di cellule APL-derivate, è possibile che l' α -enolase possa provvedere all'energia per la sintesi delle proteine necessarie per il processo differenziativo. La riduzione della sua espressione, da noi osservata in seguito alla down-modulazione di Vav1, suggerisce che quest'ultimo possa sostenere il completamento del programma maturativo ATRA-indotto di promielociti APL-derivati anche regolando specifici pathways metabolici.

La down-modulazione di Vav1 induce anche una riduzione dell'espressione dell'isoforma 2 della subunità α 3 del proteasoma, suggerendo un coinvolgimento di Vav1 nella regolazione del turnover proteico che si verifica durante il completamento del programma maturativo di promielociti tumorali.

Per quanto riguarda la fosforilazione tirosinica Syk-dipendente di Vav1, l'analisi proteomica ha evidenziato come questa sia coinvolta solo nella regolazione dell' α -tubulina, a supporto dei dati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo di ricerca, secondo i quali questo fenomeno svolge un ruolo primario nella regolazione dell'organizzazione citoscheletrica della cellula differenziante.

Come da noi precedentemente dimostrato, la fosforilazione tirosinica di Vav1 aumenta significativamente dopo trattamento con ATRA di cellule APL-derivate. Un secondo gruppo di esperimenti è stato pertanto condotto allo scopo di identificare il/i residuo/i tirosinico/i di Vav1, fosforilato/i durante il trattamento con ATRA, che gioca/no un ruolo importante nel superamento del blocco differenziativo di precursori tumorali. L'indagine è stata compiuta sulla linea cellulare NB4, che, a differenza delle cellule HL-60, presenta tutte le caratteristiche dei blasti leucemici. La proteina Vav1, immunoprecipitata da lisati di cellule controllo e differenziate, è stata sottoposta ad analisi mediante spettrometria di massa, consentendo di identificare un unico residuo tirosinico fosforilato, localizzato nella posizione 745 della proteina Vav1.

Allo scopo di determinare il ruolo funzionale del residuo Y745, le cellule NB4 sono state sottoposte a trattamento differenziante dopo transfezione con un costrutto contenente il gene di Vav1 mutato nella tripletta codificante per la tirosina in esame. L'indagine condotta sulle cellule over-esprimenti il costrutto mutato ha permesso di stabilire che il residuo Y745 di Vav1 svolge un ruolo cruciale nel processo maturativo dei promielociti APL-derivati, in quanto la sua mutazione contrasta l'azione differenziante dell'ATRA, in

termini di espressione dell'antigene di superficie CD11b e dell'acquisizione di capacità migratorie.

Poiché un ruolo funzionale per il residuo Y745 di Vav1 non è stato ancora descritto, nè in questo nè in altri modelli sperimentali, la fosforilazione di questa tirosina potrebbe essere alla base di un meccanismo attraverso il quale Vav1 svolge, nel differenziamento di promielociti APL-derivati, un ruolo alternativo a quello più noto di scambiatore guanosinico. Ulteriori studi saranno necessari per stabilire l'esatto meccanismo molecolare che coinvolge il residuo Y745, nonché la chinasi responsabile della sua fosforilazione in risposta all'agente differenziante.

Come precedentemente dimostrato dal nostro gruppo di ricerca, la fosforilazione tirosinica Syk-dipendente di Vav1, pur non avendo effetti sull'espressione dell'antigene di superficie CD11b, svolge un ruolo importante nella modificazione della morfologia delle cellule differenzianti. Poiché l'interazione tra Syk e Vav1 è mediata dal dominio SH2 di quest'ultima, dove sono presenti quattro residui tirosinici, un ulteriore obiettivo dalla ricerca riportata in questa tesi è stato quello di stabilire se tali aminoacidi possano costituire possibili substrati della chinasi e svolgano un ruolo funzionale nel corso del differenziamento granulocitario indotto da ATRA di cellule APL-derivate.

L'indagine è stata compiuta sulla linea cellulare HL-60, poiché è in questo modello sperimentale che l'interazione funzionale Syk/Vav1 è stata precedentemente dimostrata. Le cellule HL-60 sono state pertanto sottoposte a transfezione transiente con costrutti contenenti il gene di Vav1 mutato, rispettivamente, nelle triplette codificanti per i residui Y672, Y711, Y727 e Y745, localizzati nella regione SH2 di Vav1, e sottoposte a trattamento con ATRA. Sono state quindi valutate le caratteristiche correlate al raggiungimento del differenziamento granulocitario, quali l'aumento di espressione dell'antigene di superficie CD11b e l'acquisizione di capacità migratorie.

L'analisi sulle cellule over-esprimenti ha permesso di dimostrare che solo la mutazione del residuo Y745 riduce significativamente l'espressione dell'antigene di superficie CD11b durante il trattamento con ATRA delle cellule HL-60. Poiché l'inibizione della fosforilazione tirosinica Syk-dipendente di Vav1 non influisce sull'espressione di tale marcatore del differenziamento mieloide, il residuo Y745 non costituisce un possibile bersaglio della tirosina chinasi Syk.

Mediante saggi di migrazione cellulare è stato dimostrato che, dei quattro residui analizzati, solo gli aminoacidi Y672 e Y711 risultano coinvolti nella regolazione delle capacità migratorie delle cellule HL-60 differenzianti, analogamente a quanto si verifica

per la tirosina chinasi Syk. Poiché entrambi i residui tirosinici sono in grado di regolare il fenomeno di migrazione cellulare indotto da ATRA senza influenzare l'espressione dell'antigene di superficie CD11b, è plausibile ritenere che questi possono costituire substrati della tirosina chinasi Syk.

Anche in questo caso, ulteriori studi saranno necessari per descrivere con precisione il meccanismo molecolare che coinvolge le tirosine localizzate sul dominio SH2 di Vav1, nonché il loro ruolo nel processo maturativo di promielociti tumorali APL-derivati.

Complessivamente, i dati riportati in questa tesi hanno dato un contributo significativo alla comprensione del coinvolgimento di Vav1 nel processo di maturazione delle cellule APL-derivate, anche se ulteriori studi saranno necessari a stabilirne in modo completo il ruolo.

Ringraziamenti

Il lavoro riportato in questa tesi è stato realizzato grazie ai fondi MIUR (Cofin 2005, 2007) e ai fondi locali dell'Università di Ferrara (FAR) attribuiti al Prof. Silvano Capitani e alla Prof.ssa Valeria Bertagnolo.

Si ringraziano la Dott.ssa Federica Brugnoli e la Sig.ra Cinzia Carini per il prezioso supporto tecnico nelle diverse fasi della realizzazione degli esperimenti riportati in questa tesi.

BIBLIOGRAFIA

Amarasinghe G.K., Rosen M.K. Acidic region tyrosines provide access points for allosteric activation of the autoinhibited Vav1 Dbl homology domain. *Biochemistry*, 44: 15257-15268, 2005.

Avvisati G., Tallman M.S. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 16: 419-432, 2003.

Bartolini G., Orlandi M., Ammar K., Tonelli R., Franzoni M., Pession A., Rocchi P., Ferreri A.M. Growth inhibition and proapoptotic activity induction by IIF and valproic acid on RA-resistant leukemia cells. *Anticancer Res.*, 28: 283-288, 2008.

Bertagnolo V., Neri L.M., Marchisio M., Mischiati C., Capitani S. Phosphoinositide 3-kinase activity is essential for ATRA-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res.*, 59: 542-546, 1999.

Bertagnolo V., Marchisio M., Brugnoli F., Bavelloni A., Boccafogli L., Colamussi M.L., Capitani S. Requirement of tyrosine-phosphorylated Vav for morphological differentiation of all-trans-retinoic acid-treated HL-60 cells. *Cell. Growth Differ.*, 12: 193-200, 2001 b.

Bertagnolo V., Marchisio M., Neri L.M., Bertolaso L., Bassini A., Brugnoli F., Gonelli A., Capitani S. Nuclear inositide-metabolism in granulocytic differentiation of myeloid cells. *Recent Res. Devel. Cancer*, 3: 525-539, 2001 a.

Bertagnolo V., Brugnoli F., Marchisio M., Celeghini C., Carini C., Capitani S. Association of PI 3-K with tyrosine phosphorylated Vav is essential for its activity in neutrophil-like maturation of myeloid cells. *Cell. Signal.*, 16: 423-433, 2004.

Bertagnolo V., Brugnoli F., Mischiati C., Sereni A., Bavelloni A., Carini C., Capitani S. Vav promotes differentiation of human tumoral myeloid precursors. *Exp. Cell. Res.*, 306: 53-63, 2005.

Bertagnolo V., Grassilli S., Bavelloni A., Brugnoli F., Piazzini M., Candiano G., Petretto A., Benedusi M., Capitani S. Vav1 modulates protein expression during ATRA-induced maturation of APL-derived promyelocytes: a proteomic-based analysis. *J Proteome Res.*, 7: 3729-3736,

2008.

Blaner W.S., Mendelsohn C.L. Retinoid Inactivation: Survival Factor for Male Germ Cells. *Endocrinology*, 148: 4557-4559, 2007.

Bottino C., Castriconi R., Pende D., Rivera P., Nanni M., Carnemolla B., Cantoni C., Grassi J., Marcenaro S., Reymond N., Vitale M., Moretta L., Lopez M., Moretta A. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.*, 198: 557-567, 2003.

Bowles J., Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*, 134: 3401-3411, 2007.

Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77: 2936-2940, 1980.

Brugnoli F., Bovolenta M., Benedusi M., Miscia S., Capitani S., Bertagnolo V. PLC-beta2 monitors the drug-induced release of differentiation blockade in tumoral myeloid precursors. *J Cell Biochem*, 98: 160-173, 2006.

Brugnoli F., Bavelloni A., Benedusi M., Capitani S., Bertagnolo V. PLC-beta2 activity on actin-associated polyphosphoinositides promotes migration of differentiating tumoral myeloid precursors. *Cell Signal.*, 19: 1701-1712, 2007.

Bustelo X.R. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol.*, 20: 1461-1477, 2000.

Bustelo X.R. Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene*, 20: 6372-6381, 2001.

Bustelo X.R. Regulation of Vav proteins by intramolecular events. *Front Biosci.*, 7: 24-30, 2002.

Cassinat B., Chomienne C. Biological features of primary APL blasts: their relevance to the understanding of granulopoiesis, leukemogenesis and patient management. *Oncogene*, 20: 7154-7160, 2001.

Chrencik J.E., Brooun A., Zhang H., Mathews I.I., Hura G.L., Foster S.A., Perry J.J., Streiff M., Ramage P., Widmer H., Bokoch G.M., Tainer J.A., Weckbecker G., Kuhn P. Structural basis of

guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1. *J Mol Biol*, 380: 828-843, 2008.

Coppolino M.G., Krause M., Hagendorff P., Monner D.A., Trimble W., Grinstein S., Wehland J., Sechi A.S. Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J. Cell. Sci.*, 114: 4307-4318, 2001.

Datta D., Gerardi D.A. Retinoic acid syndrome. *Conn. Med.*, 67: 541-543, 2003.

Degos L., Yi Wang Z. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20: 7140-7145, 2001.

De la Serna J., Montesinos P., Vellenga E. Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin. *Blood*, 111: 3395-3402, 2008.

Doody G.M., Bell S.E., Vigorito E., Clayton E., McAdam S., Tooze R., Fernandez C., Lee I.J., Turner M. Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation. *Nat Immunol*, 2: 542-547, 2001.

Douer D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 16: 359-362, 2003.

Gakidis M.A., Cullere X., Olson T., Wilsbacher J.L., Zhang B., Moores S.L., Ley K., Swat W., Mayadas T., Brugge J.S. Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J Cell Bio*, 166: 273-282, 2004.

Gallagher R.E. Retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, 16: 1940-1958, 2002.

Golczak M., Maeda A., Bereta G., Maeda T., Kiser P.D., Hunzelmann S., von Lintig J., Blaner W.S., Palczewski K. Metabolic basis of visual cycle inhibition by retinoid and nonretinoid compounds in the vertebrate retina. *J Biol Chem*, 283: 9543-9554, 2008.

Gomez T.S., Hamann M.J., Mc Carney S., Savoy D.N., Lubking C.M., Heldebrant M.P., Labno C.M., McKean D.J., McNiven M.A., Burkhardt J.K., Billadeau D.D., Dynamin 2 regulates T cell

activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nat. Immunol.*, 6: 261-270, 2005.

Gotoh A., Takahira H., Geahlen R.L., Broxmeyer H.E. Cross-linking of integrins induces tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product Vav and the protein tyrosine kinase Syk in human factor-dependent myeloid cells. *Cell Growth Differ*, 8: 721-729, 1997.

Gu B.W., Xiong H., Zhou Y., Chen B., Wang L., Dong S., Yu Z.Y., Lu L.F., Zhong M., Yin H.F., Zhu G.F., Huang W., Ren S.X., Gallagher R.E., Waxman S., Chen G.Q., Wang Z.G., Chen Z., Fu G., Chen S.J. Variant-type PML-RAR (alpha) fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic coding sequence from intron 2 of the RAR(alpha) gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 7640-7645, 2002.

Harris M.N., Ozpolat B., Abdi F., Gu S., Legler A., Mawuenyega K.G., Tirado-Gomez M., Lopez-Berestein G., Chen X. Comparative proteomic analysis of all-*trans*-retinoic acid treatment reveals systematic posttranscriptional control mechanisms in acute promyelocytic leukaemia. *Blood*, 104: 1314-1323, 2004.

Hobert O., Schilling J.W., Beckerle M.C., Ullrich A., Jallal B. SH3 domain-dependent interaction of the proto-oncogene product Vav with the focal contact protein zyxin. *Oncogene*, 12: 1577-1581, 1996.

Hornstein I., Alcover A., Katzav S. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell. Signal.*, 16: 1-11, 2004.

Houlard M., Arudchandran R., Regnier-Ricard F., Germani A., Gisselbrecht S., Blank U., Rivera J., Varin-Blank N. Vav1 is a component of transcriptionally active complexes. *J. Exp. Med.*, 195: 1115-1127, 2002.

Hsu H.C., Tsai W.H., Chen P.G., Hsu M.L., Ho C.K., Wang S.Y. In vitro effect of granulocyte-colony stimulating factor and all-*trans* retinoic acid on the expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules in acute promyelocytic leukemic cells. *Eur. J. Haematol.*, 63: 11-18, 1999.

James S.Y., Williams M.A., Newland A.C., Colston K.W. Leukemia cell differentiation: cellular and molecular interactions of retinoids and vitamin D. *Gen Pharmacol.*, 32: 143-154, 1999.

Jensen K., Shiels C., Freemont P. S. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*, 20: 7223-7233, 2001.

Katzav S. Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood*, 103: 2443-2451, 2004.

Katzav S. Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Lett.* 255: 241-254, 2007.

Katzav S. Vav1: A hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. doi:10.1016/j.biocel.2008.11.006

Keely P.J., Westwick J.K., Whitehead I.P., Der C.J., Parise L.V. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*, 390: 632-636, 1997.

Kim C., Marchal C.C., Penninger J., Dinaver M.C., The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J. Immunol.* 171: 4425-4430, 2003.

Kjarland E., Keen T.J., Kleppe R. Does isoform diversity explain functional difference in the 14-3-3 protein family? *Curr.Pharm. Biotechnol.*, 7: 217-223, 2006.

Kogan S.C., Bishop J.M. Acute promyelocytic leukemia: from treatment to genetics and back. *Oncogene* 18: 5261-5267, 1999.

Lallemand-Breitenbach V., Guillemain M.C., Janin A., Daniel M.T., Degos L., Kogan S.C., Bishop J.M., de Thé H. Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med.*, 189: 1043-1052, 1999.

Lane J., Martin T.A., Mansel R.E., Jiang W.G. The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol.* 5: 23, 2008. doi:10.1186/1477-7800-5-23

Lanotte M., Martin-Thouvenin V., Najman S., Balerini P., Valensi F., Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood*, 77: 1080-1086, 1991.

Larson R.S., Tallman M.S. Retinoic acid syndrome: manifestations, pathogenesis, and treatment. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 16: 453-461, 2003.

Lazer G., Pe'er L., Schapira V., Richard S., Katzav S. The association of Sam68 with Vav1 contributes to tumorigenesis. *Cell Signal*, 19: 2479-2486, 2007.

Lee B.D., Sevcikova S., Kogan S.C. Dual treatment with FLT3 inhibitor SU11657 and doxorubicin increases survival of leukemic mice. *Leuk Res.*, 31: 1131-1134, 2007.

Li S., Yamauchi A., Marchal C.C., Molitoris J.K., Quilliam L.A., Dinauer M.C. Chemoattractant-stimulated Rac activation in wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. *J Immunol*, 169: 5043-5051, 2002.

Liou J.Y., Ghelani D., Yeh S., Wu K.K. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Induce Colorectal Cancer Cell Apoptosis by Suppressing 14-3-3 ϵ *Cancer Res.* 67: 3185-3191, 2007.

Liso V., Bennet J. Morphological and cytochemical characteristics of leukaemic promyelocytes. *Best. Pract. Res. Clin. Hematol.*, 16: 349-355, 2003.

Lo Coco F., Diverio D., Pandolfi P.P., Biondi A., Rossi V., Avvisati G., Rambaldi A., Arcese W., Petti M.C., Meloni G., et al. Molecular evaluation of residual disease as a predictor of relapse in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*, 340: 1437-1438, 1992.

Lo Coco F., Ammatuna E., Noguera N. Treatment of acute promyelocytic leukemia with gentuzumab ozogamicin. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 4: 57-62, 2006.

López-Lago M., Lee H., Cruz C., Movilla N., Bustelo X.R. Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol*, 20: 1678-1691, 2000.

Lopez-Pedraza C., Villalba J.M., Siendones E., Barbarroja N., Gómez-Díaz C., Rodríguez-Ariza A., Buendía P., Torres A., Velasco F. Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics*, 6: 293-299, 2006.

Marchisio M., Bertagnolo V., Colamussi M.L., Capitani S., Neri L.M., Phosphatidylinositol 3-

kinase in HL-60 nuclei is bound to the nuclear matrix and increases during granulocytic differentiation *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253: 346-351, 1998.

Margolis B., Katvaz S., Ulrich A., Weiss A., Schlessinger J. Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature*. 356: 71-74, 1992.

Martinez J.D. 14-3-3 proteins: do they have a role in human cancer? *Future Oncol.*, 1: 631-633, 2005.

Miletic A.V., Sakata-Sogawa K., Hiroshima M., Hamann M.J., Gomez T.S., Ota N., Kloeppel T., Kanagawa O., Tokunaga M., Billadeau D.D., Swat W. Vav1 acidic region tyrosine 174 is required for the formation of T cell receptor-induced microclusters and is essential in T cell development and activation. *J. Biol. Chem.*, 281: 38257-38265, 2006.

Miller W.H.Jr., Waxman S. Differentiation induction as a treatment for hematologic malignancies. *Oncogene*, 21: 3496-3506, 2002.

Miranti C.K., Leng L., Maschberger P., Brugge J.S., Shattil S.J. Identification of a novel integrin signalling involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol.*, 8: 1289-1299, 1998.

Mistry A.R., Pedersen E.W., Solomon E., Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.*, 17: 71-97, 2003.

Moores S.L., Selfors L.M., Fredericks J., Breit T., Fujikawa K., Alt F.W., Brugge J.S., Swat W. Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 6364-6373, 2000.

Musante L., Bruschi M., Candiano G., Petretto A., Dimasi N., Del Boccio P., Urbani A., Rialdi G., Ghiggeri G.M. Characterization of oxidation end product of plasma albumin 'in vivo'. *Biochem Biophys Res Commun.*, 349: 668-673, 2006.

Neves H., Ramos C., Silva M.G., Parreira A., Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*, 93: 1197-1207, 1999.

Olins A.L., Herrmann H., Lichter P., Olins D.E. Retinoic Acid Differentiation of HL-60 Cells Promotes Cytoskeletal Polarization. *Exp. Cell Res.*, 254: 130-142, 2000.

Paietta E. Expression of cell-surface antigens in acute promyelocytic leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, 16: 369-385, 2003.

Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in disease. *Cell Mol Life Sci.*, 58: 902-920, 2001.

Park T.S., Lee S.T., Kim J.S., Song J., Lee K.A., Kim S.J., Seok Y.M., Lee H.J., Han J.H., Kim J.K., Lee E.Y., Choi J.R. Acute promyelocytic leukemia in early pregnancy with translocation t(15;17) and variant PML/RARA fusion transcripts. *Cancer Genet Cytogenet.*, 188: 48-51, 2009.

Pearce A.C., Wilde J.I., Doody G.M., Best D., Inoue O., Vigorito E., Tybulewicz V.L., Turner M., Watson S.P. Vav1, but not Vav2, contributes to platelet aggregation by CRP and thrombin, but neither is required for regulation of phospholipase C. *Blood*, 100: 3561-3569, 2002.

Porter G.W., Khuri F.R., Fu H. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol.*, 16: 193-202, 2006.

Pradip D., Peng X., Durden D.L. Rac2 specificity in macrophage integrin signaling: potential role for Syk kinase. *J Biol Chem*, 278: 41661-41669, 2003.

Prisco A., Vanes L., Ruf S., Trigueros C., Tybulewicz V.L. Lineage-specific requirement for the PH domain of Vav1 in the activation of CD4⁺ but not CD8⁺ T cells. *Immunity*, 23: 263-274, 2005.

Quezada G., Kopp L., Estey E., Wells R.J. All-trans-retinoic acid and arsenic trioxide as initial therapy for acute promyelocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 51: 133-135, 2008.

Rapley J., Tybulewicz V.L., Rittinger K. Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO Rep*, 9: 655-661, 2008.

Ravandi F., Estey E., Jones D., Faderl S., O'Brien S., Fiorentino J., Pierce S., Blamble D., Estrov Z., Wierda W., Ferrajoli A., Verstovsek S., Garcia-Manero G., Cortes J., Kantarjian H. Effective Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia With All-Trans-Retinoic Acid, Arsenic Trioxide, and Gemtuzumab Ozogamicin. *J Clin Oncol.*, 27: 504-510, 2008.

Ribeiro R.C., Rego E. Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaborations. *Hematology*, 2006: 162-168, 2006.

Ridley A.J. Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Lett*, 498: 168-171, 2001.

Romero F., Dargemont C., Pozo F., Reeves W.H., Camonis J., Gisselbrecht S., Fischer S. p95vav associates with the nuclear protein Ku-70. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 37-44, 1996.

Romero F., Germani A., Puvion E., Camonis J., Varin-Blank N., Gisselbrecht S., Fischer S., Vav binding to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C. Evidence for Vav-hnRNP interactions in an RNA-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, 273: 5923-5931, 1998.

Rouard H., Tamasdan S., Fridman W.H., Teillaud J.L. Vav and SLP-76 recruitment by cross-linking of FcγRIIIa1 in promyelocytic HL-60 cells. *Immunol Lett*; 68: 347-353, 1999.

Sanz M.A., Lo Coco F., Martín G., Avisati G., Rayón C., Barbui T., Díaz-Mediavilla J., Fioritoni G., González J.D., Liso V., Esteve J., Ferrara F., Bolufer P., Bernasconi C., Gonzalez M., Rodeghiero F., Colomer D., Petti M.C., Ribera J.M., Mandelli F. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*, 96: 1247-1253, 2000.

Sanz M.A., Martin G., Lo Coco F. Choice of chemotherapy in induction, consolidation and maintenance in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 16: 433-451, 2003.

Schneider H., Rudd C.E. CD28 and Grb-2, relative to Gads or Grap, preferentially co-operate with Vav1 in the activation of NFAT/AP-1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun.*, 369: 616-621, 2008.

Schymeinsky J., Sindrilaru A., Frommhold D., Sperandio M., Gerstl R., Then C., Mócsai A., Scharffetter-Kochanek K., Walzog B. The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration. *Blood*, 108: 3919-3927, 2006.

Servant G., Weiner O.D., Herzmark P., Balla T., Sedat J.W., Bourne H.R. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*, 287: 1037-1040,

2000.

Sirulnik A., Melnick A., Zelent A., Licht J. Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants. *Best Pract. Res. Clin. Haematol*, 16: 387-408, 2003.

Slack J.L., Waxman S., Tricot G., Tallmann M.S., Bloomfield C.D. Advances in the management of acute promyelocytic leukemia and other hematologic malignancies with arsenic trioxide. *The Oncologist*, 7: 1-13, 2002.

Takenawa T., Itoh T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1533: 190-206, 2001.

Tallman M.S., Nabhan C., Feusner J.H., Rowe J.M. Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood*, 99: 759-767, 2002.

Tallman M.S. Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 20: 57-65, 2007.

Tallman M.S. The expanding role of arsenic in acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol.*, 45: S25-S29, 2008.

Tallman M.S, Altman J.K. Curative strategies in acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2008: 391-399, 2008.

Tedford K., Nitschke L., Girkontaite I., Charlesworth A., Chan G., Sakk V., Barbacid M., Fischer K.D. Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling. *Nat Immunol*, 2: 548-555, 2001.

Turner M. The role of Vav proteins in B cell responses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 512: 29-34, 2002.

Turner M., Billadeau D. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, 2: 476-486, 2002.

Tybulewicz V.L. Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol.*,17: 267-274, 2005.

Tzivion G., Gupta V.S., Kaplun L., Balan V. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin. Cancer. Biol.*,16: 203-213, 2006.

Van Der Hoeven P.C., Van Der Wal J.C., Ruurs P., Van Blitterswijk W.J. Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3. *Biochem. J.*, 347: 781-785, 2000.

Vedham V., Phee H., Coggeshall K.M. Vav activation and function as a rac guanine nucleotide exchange factor in macrophage colony-stimulating factor-induced macrophage chemotaxis. *Mol Cell Biol*, 25: 4211-4220, 2005.

Veselská R., Zitterbart K., Jelínková S., Neradil J., Svoboda A. Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncol Rep.*, 10: 1049-1058, 2003.

Visani G., Tosi P., Ottaviani E., Zaccaria A., Baccini C., Manfroi S., Pastano R., Remiddi C., Morelli A., Molinari A.L., Zanchini R., Tura S. All-trans retinoic acid and in vitro cytokine production by acute promyelocytic leukemia cells. *Eur J Haematol.*, 57: 301-306, 1996.

Von Mikecz A. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci.*, 119: 1977-1984, 2006.

Walter R.B., Raden B.W., Kamikura D.M., Cooper J.A., Bernstein I.D. Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity. *Blood*, 105: 1295-1302, 2005.

Wang D., Jensen R., Gendeh G., Williams K., Pallavicini M.G. Proteome and transcriptome analysis of retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells, NB4. *J Proteome Res.*, 3: 627-635, 2004.

Wang Z.Y., Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 111: 2505-2515, 2008.

Wells C.M., Bhavsar P.J., Evans I.R., Vigorito E., Turner M., Tybulewicz V., Ridley A.J. Vav1 and Vav2 play different roles in macrophage migration and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res.*, 310: 303-310, 2005.

Xing H., Zhang S., Weinheimer C., Kovacs A., Muslin A.J. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *The EMBO Journal*, 19: 349-358, 2000.

Yang F.C., Atkinson S.J., Gu Y., Borneo J.B., Roberts A.W., Zheng Y., Pennington J., Williams D.A. Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 5614-5618, 2001.

Yuo A., Kitagawa S., Iki S., Yagisawa M., Inuo E.K., Mimura T., Minoda S., Hanazono Y., Hirai H., Urabe A., Miwa A., Togawa A., Takaku F. Tyrosine phosphorylation of vav protooncogene product in primary human myelogenous leukemic cells stimulated by granulocyte colony-stimulating factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 211: 677-685, 1995.

Zhao T., Benard V., Bohl B.P., Bokoch G.M. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *J Clin Invest*, 104: 1732-1740, 2003.

Zou L., Wu Y., Pei L., Zhong D., Gen M., Zhao T., Wu J., Ni B., Mou Z., Han J., Chen Y., Zhi Y. Identification of leukemia-associated antigens in chronic myeloid leukemia by proteomic analysis. *Leuk Res.*, 29: 1387-1391, 2005.

Testi

Castoldi G. e Liso V. *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*. McGraw-Hill, 2001.

Siti consultati:

<http://www.registri-tumori.it>, AIRT, *Epidemiologia & Prevenzione* 30 (1) gennaio-febbraio 2006 suppl.2.

<http://www.registri-tumori.it>, AIRT, *Epidemiologia & Prevenzione* 32 (1) gennaio-febbraio 2008 suppl.2.

APPENDICE

La produzione scientifica consiste in 2 pubblicazioni su riviste internazionali dotate di collegio di revisori, di seguito allegate:

- Brugnoli F, **Grassilli S**, Benedusi M, Capitani S, Bertagnolo V. RNA interference in the study of molecular mechanisms activated during agonist induced differentiation of acute promyelocytic leukemia derived promyelocytes, *Minerva Biotecnologica*, 20: 39-49, 2008.
- Bertagnolo V, **Grassilli S**, Bavelloni A, Brugnoli F, Piazzini M, Candiano G, Petretto A, Benedusi M, Capitani S. Vav1 modulates protein expression during ATRA induced maturation of APL derived promyelocytes: a proteomic-based analysis, *Journal of Proteome Research*, 7: 3729-3736, 2008.

RNA interference in the study of molecular mechanisms activated during agonist induced differentiation of acute promyelocytic leukemia derived promyelocytes

F. BRUGNOLI¹, S. GRASSILLI¹, M. BENEDESI¹, S. CAPITANI^{1,2}, V. BERTAGNOLO

Acute promyelocytic leukemia (APL), the M3 subtype of acute myeloid leukemia, is one of the most successful examples of translational research in medicine, since the coordinated combination of laboratory and clinical studies has transformed this leukemia from a fatal into a curable disease. In particular, the introduction of all-trans retinoic acid (ATRA) in APL therapy opened a new page in the history of tumor treatment, since this agonist is capable of inducing morphologic and functional maturation of APL blasts. In both APL blasts and APL-derived cell lines, ATRA-induced progression of promyelocytes to a more mature state is mediated through a complex regulation of gene transcription. The events mediated by proteins codified by ATRA target genes that account for the complex and integrated network of intracellular signaling pathways responsible of the completion of maturation, are still largely unknown. In the last few years, the application of siRNA procedures to the study of molecular mechanisms that lead tumoral myeloid precursors to mature along the granulocytic lineage has permitted to establish the specific role of a number of intracellular signaling molecules in a wide range of cell functions, including cell cycle regulation and control of gene expression. In particular, for some of these, as PLC- β 2 and Vav1, it was established a role in promoting maturation of APL-derived promyelocytes and in regulating the modifications of the cytoskeleton

Fundings. This research was supported by grants from MIUR Cofin (2005), Interdisciplinary Center for the Study of Inflammation (ICSI) and local funds from University of Ferrara (Italy) to S. Capitani and V. Bertagnolo.

Received on April 21, 2008.

Accepted for publication on May 29, 2008.

Address reprint requests to: V. Bertagnolo, Signal Transduction Unit, Laboratory of Cell Biology Section of Human Anatomy, Department of Morphology and Embryology, Via Fossato di Mortara 66, 44100 Ferrara, Italy. E-mail: bgv@unife.it

¹Signal Transduction Unit, Laboratory of Cell Biology
Section of Human Anatomy, Department of Morphology and
Embryology, University of Ferrara, Ferrara, Italy
²MIUR ICSI (Interdisciplinary Center for the
Study of Inflammation)
University of Ferrara, Ferrara, Italy

architecture that accompany maturation related motility and migration. The identification of molecules that play crucial roles in the differentiation of APL cells will, ultimately, allow recognizing new possible targets for future therapies of APL patients.

Key words: Leukemia, promyelocytic, acute - Neutrophil differentiation - RNA, small interfering.

Acute promyelocytic leukemia

Acute Promyelocytic Leukemia (APL), the M3 subtype of acute myeloid leukemia according to the French-American-British (FAB) classification, is characterized by a maturation block of myeloid precursors leading to an accumulation of abnormal heavily granulated promyelocytes in peripheral blood and bone marrow.¹ The genetic hallmark of more than 95% of APL patients is the balanced reciprocal translocation t(15;17)(q22;q21), involving the genes encoding for the retinoic acid receptor- α (RAR α) and for the promyelocytic leukemia protein (PML) and resulting in expression of the chimerical protein PML/RAR α .¹ RAR α , a member of the retinoic acid nuclear receptors family, acts as a ligand-inducible transcription factor by binding to specific response elements (RAREs) at the pro-

motor region of target genes.¹ PML, detected in the nuclear bodies multiprotein complexes, belongs to a family of proteins implicated in tumor suppression and control of genomic stability. In particular, PML controls p53-dependent induction of cell apoptosis, growth suppression and senescence in response to ionizing radiation and oncogenic transformation.¹

The fusion protein PML/RAR α is able to form heterodimers with retinoid X receptors (RXRs) that inhibit the transcription of genes essential for granulocytic differentiation. The molecular complexes directly bind to RAREs in their regulatory regions and then recruit co-repressors that induce chromatin condensation and transcriptional suppression.¹ In addition, PML/RAR α is able of recruiting the methylating enzymes Dnmt1 and Dnmt3a, leading to the hypermethylation of promoter sequences on retinoic acid downstream genes, whose transcription is thus repressed.¹

APL, that constitutes about 10% of AML,² is one of the most successful examples of translational research in medicine.³ In the last decades, an extraordinary combination of laboratory and clinical studies has contributed to transform this disease from a fatal into a curable acute leukemia. Moreover, APL represents a model to understand key mechanisms of leukemogenesis and a paradigm for innovative treatments of myeloid leukemias.³

APL therapy

The primal APL treatments were based on chemotherapy, aimed to inhibit the proliferation of malignant cells. In the early 1980s, the introduction of all-*trans* retinoic acid (ATRA) opened a new page in the history of APL since this agonist is capable of inducing morphological and functional maturation of APL blasts.⁴ The conformation changes of the fusion protein PML/RAR α , induced by pharmacological concentrations of ATRA, are at the basis of this phenomenon. This results in the dissociation of the co-repressor complex from RAR α , the ATRA preferred receptor, and in the recruitment of a co-activator complex opening the chromatin structure and relieving transcriptional repression.¹ The resulting transcription activity modulates a large number of genes encoding proteins involved in the completion of granulocytic differentiation, such as granulopoiesis associated tran-

scription factors, cytokines/cytokine receptors, as well as their downstream signal transduction molecules.⁵ ATRA also induces a caspase-mediated degradation of PML/RAR α by activating ubiquitin/proteasome systems dependent on the binding of SUG-1 in the AF-2 trans-activation domain of RAR α .⁵

Despite the use of ATRA constitutes a great advance in the therapy of APL, inducing higher remission rate and overall survival in comparison to chemotherapy alone, the ATRA based therapy requires several administrations that are often responsible of undesired side effects such as the differentiation associated syndrome as well as of resistance to retinoids.³

The need of novel therapeutic approaches in the treatment of APL patients has introduced, about 10 years ago, As₂O₃ (ATO), extensively used in traditional Chinese medicine.⁶ Currently, ATO represents an effective agent to induce complete remission in patients with relapsed and refractory APL, as well as in patients with newly diagnosed APL.⁶ Furthermore, the use of ATRA/ATO combinations brings much better results than the two drugs used alone, in terms of remission and of disease-free survival status.⁷ ATO, at variance with ATRA, does not act through nuclear receptors but, even if with a different mechanism in respect to retinoids, induces the degradation of the leukemogenic protein PML/RAR α .⁵

In the last few years, several new agents with potential activity in inducing remission of APL are being studied. Among these, Tamibarotene, a synthetic retinoid recently approved for treatment of relapsed or resistant APL.⁵ Compared to ATRA, Tamibarotene is more stable and more potent as inducer of APL blasts differentiation. In about 40% of patients not responsive to this molecule, the inefficiency seems to be due to genetic mutations of RAR α , its specific nuclear receptor.⁵

Modern approaches to APL therapy include the combination of ATRA administration and anthracycline-based chemotherapy. In particular, the use of calicheamicin conjugated with a monoclonal antibody directed against CD33 (GO, Gemtuzumab Ozogamicin) takes advantages from the high expression of this surface antigen on APL cells.⁸ Engagement of GO by CD33 results in its internalization and hydrolytic release of calicheamicin which, in turn, causes irreversible DNA damages and cell death. Preliminary reports have highlighted the sensitivity of APL to GO administered in combination with other agents, like conventional chemotherapy, ATRA and ATO.⁸

Differentiation treatments of APL-derived cells

The elucidation of the intracellular mechanisms leading to granulocytic differentiation and the identification of molecules whose expression and regulation are altered in APL cells constitute an important issue to identify new therapeutic approaches directed to restore the function of the deficient/modified proteins.

The majority of the studies aimed to clarify the molecular mechanisms involved in the completion of the maturation program of APL blasts were performed on APL-derived cell lines, suitable *in vitro* models to investigate the intracellular signaling pathways activated by differentiating agents.

HL-60 is an early promyelocytic cell line derived from a patient with APL that, despite lacking the typical chromosomal translocation, responds to micromolar doses of different agonists by differentiating along myeloid lineages.⁹ The more reliable *in vitro* model for the study of APL is constituted by NB4, a cell line derived from a patient with APL, that, at variance with HL-60, shows the t(15;17) translocation.¹⁰ In both cell lines, ATRA treatment induces the progression of maturation along granulocytic lineage; however, only NB4 cells reach a neutrophil-like phenotype, as demonstrated by the high levels of surface antigens expression and by the acquisition of a fully polylobated nucleus.¹¹

Also low doses of ATO induce a partial differentiation of both the APL-derived HL-60 and NB4 cells, while high concentrations of this molecule inhibit cell growth mainly through apoptosis.¹² Furthermore, a synergism between ATRA and ATO in inducing granulocytic differentiation has been observed in NB4 cells as well as in NB4-derived cell lines resistant to one of the two agonists.⁷

As in APL blasts, ATRA-induced progression of APL-derived cell to a more mature state is mediated through a well known regulation of gene transcription.¹ Integrated approaches including cDNA microarray, proteomics and computational biology, revealed that ATRA-induced differentiation involves essentially transcriptional remodeling, while the effects of ATO reside mainly at the proteome level, creating a molecular basis for the synergistic effects between ATRA and ATO.⁵

At any rate, the events mediated by proteins codified by ATRA target genes,¹³ that account for the complex and integrated network of intracellular signaling pathways responsible of the completion of maturation, are largely unknown.

RNA interference to understand the specific role of signaling molecules

Currently, an effective method to quickly analyze the functions of specific proteins in a wide variety of cellular processes is furnished by RNA interference (RNAi) technology. RNAi is a process in which double-stranded RNA suppresses expression of a target protein by stimulating the specific degradation of its mRNA.¹⁴ In particular, this is a multistep procedure in which small interfering RNAs (siRNAs) of 21–25 nucleotides, chemically or enzymatically produced *in vitro*, are introduced inside the cells by transfection procedures. SiRNAs are then incorporated into RNAi targeting complexes known as RISC (RNA-induced silencing complex) that destroy mRNAs homologous to siRNA. To identify the optimal target mRNA sequence, ended to ensure specificity and to minimize off-target effects of siRNA, several tools are now available. Since, in general, it is not possible to predict the optimal siRNA sequence for a given target protein, a mixture of multiple siRNAs needs to be used.¹⁴

In the last few years, the application of siRNA procedure to the study of the molecular mechanisms that lead tumoral myeloid precursors to mature along the granulocytic lineage has permitted to establish the role of a number of intracellular signaling molecules involved in a wide range of cell functions, including cell cycle regulation and control of gene expression.

Cell cycle/apoptosis-related molecules

The silencing of the mRNA for phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) constitutes one of the first example of the use of siRNA in the study of proteins involved in maturation of APL-derived cells.¹⁵ ATRA treatment induces, in both NB4 and HL-60 cells, increase of the expression of PLSCR1, originally known for its capacity to promote trans-bilayer movement of membrane phospholipids, playing an important role in cell proliferation, maturation and apoptosis. The expression of PLSCR1 during ATRA-dependent differentiation results to be dependent on agonist induced PKC- δ phosphorylation.¹⁵ On the other hand, the decreased PLSCR1 expression by means of specific siRNAs inhibits ATRA induced granulocytic differentiation.¹⁵ This indicates that, although its precise biologic function(s) remains to be determined, PLSCR1, induced upon activation of PKC- δ , is required for ATRA-triggered differentiation of tumoral promyelocytes.¹⁵

A further example of the use of siRNA in ATRA induced maturation of APL-derived promyelocytes allowed to establish the relationship between expression of UBE1L (ubiquitin-activating enzyme-E1-like protein) and ISG15 (ubiquitin-like species, interferon-stimulated gene, 15-kDa protein), their physical association and coordinate regulation as well as the induced ISG15 conjugation during granulocytic differentiation.¹⁶ ATRA treatment of APL-derived cells induces an increased expression of UBE1L, that triggers PML/RAR α degradation and apoptosis. In particular UBE1L associates with ISG15 and induces its conjugation. It was reported that targeting UBE1L mRNA with specific siRNAs inhibited ATRA-induced ISG15 conjugation and, ultimately, the terminal maturation of NB4 cells.¹⁶

The serine/threonine protein kinase B (PKB)/Akt acts downstream of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and functions as an essential mediator in many growth-factor-induced cellular responses including metabolism, proliferation and cell survival. The Akt-mediated phosphorylation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member BAD, of caspase 9, and of apoptosis signal-regulated kinase 1 (Ask1) inhibits their pro-apoptotic function.¹⁷ The Akt-activity was found to be up-regulated in ATRA-differentiated HL-60 and NB4 cells and the down-modulation of Akt expression by siRNAs in ATRA-treated HL-60 cells reduces the CD11b expression level, suggesting that PI3K/Akt inhibitors may block the anti-tumor properties of retinoids.¹⁸

It was demonstrated that HL-60 cells over-expressing the focal adhesion kinase (FAK) present a marked resistance against various apoptotic stimuli and do not respond to ATRA treatment.¹⁹ In particular, in FAK over-expressing cells, the ATRA dependent activation of C/EBP α is impaired and this transcription factor does not associate with retinoblastoma protein (pRb), that results hyper-phosphorylated and then inactive.¹⁹ The introduction of FAK specific siRNAs into FAK-over-expressing HL-60 cells resulted in the recovery of sensitivity to ATRA-induced differentiation.¹⁹

Several other examples of silencing of proteins involved in cell death during agonist-induced granulocytic differentiation of tumoral myeloid precursors have been reported. Several members of Bcl-2 family, like Bfl-1/A1, have been found to be up-regulated by ATRA and correlated with inhibition of apoptosis.²⁰ The silencing of Bfl-1/A1, by using specific siRNAs, partially restores the sensitivity of ATRA-treated NB4 cells to doxorubicin (Dox) induced apopto-

sis.²⁰ These data suggest that increased expression of Bfl-1/A1 in the HL-60 and NB4 cell lines undergoing differentiation contributes to a loss of sensitivity to chemotherapy-induced apoptosis.

It is known that the ligand CDDO (2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid) of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ), member of the nuclear receptor family that forms heterodimers with RXR, enhances pro-apoptotic effects of ATRA in NB4 cells.²¹ The silencing of PPAR γ mRNA by specific interfering sequences diminished CDDO-induced maturation in NB4 cells.²¹

Recently, the silencing of the death-associated protein kinase 2 (DAPK2), a Ca²⁺/calmodulin-regulated serine/threonine kinase involved in apoptosis that reaches high expression levels in ATRA-treated NB4 cells, reduces ATRA-induced granulocytic differentiation of this cell line.²² This was evidenced by lack of morphological changes and by the decreased expression of neutrophil stage-specific maturation genes, such as CD11b, G-CSF receptor, C/EBP ϵ and lactoferrin, during the maturation process.²²

Down-modulation of MEK1 (mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1) phosphorylation inhibits proliferation and induces apoptosis of primary AML blasts.²³ ATO and MEK1 inhibition synergize to induce apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells.²³ In addition, analogously to Bfl-1/A1, the down-modulation of MEK1 with specific double-stranded RNA oligonucleotides restored ATO sensitivity in a NB4 cell line resistant to ATO-induced apoptosis.²³

Furthermore, the functional analysis of the human apoptosis-related protein (PNAS-2) performed by means of siRNA in NB4 cells indicate that this molecule has an anti-apoptotic role and participates in leukemogenesis.²⁴

About the regulation of cell cycle, only little information was obtained by the use of siRNA technologies. The silencing of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2D3 that is up-regulated in ATRA-treated NB4 cells and mediates ATRA-induced cyclin D1 degradation, leads to blockage of ATRA-dependent cyclin D1 degradation and cell-cycle arrest.²⁵

Gene regulation molecules

The mechanisms by which retinoids regulate initiation of mRNA translation for proteins that mediate their biological effects are not well known and the use

of siRNA represents methods to find new information. In particular, expression of the programmed cell death-4 (PDCD4), a tumor suppressor protein that inhibits protein synthesis by suppression of translation initiation, is markedly up-regulated during ATRA-induced granulocytic differentiation of APL-derived NB4 and HL-60 cell lines, in primary APL blasts and in CD34+ hematopoietic progenitor cells.²⁶ The knockdown of PDCD4 by RNA interference inhibits ATRA-induced granulocytic differentiation and reduces the expression of key proteins known to be up-regulated by ATRA, including p27Kip1 and DAP5/p97, and induced c-myc and Wilms' tumor 1, but does not alter the expression of c-jun, p21Waf1/Cip1, and tissue transglutaminase (TG2).²⁶

Recent studies report that the treatment of APL-derived NB4 cells with ATRA results in the dissociation of the translational repressor 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) from the eukaryotic initiation factor eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) and in the subsequent formation of eIF4G-eIF4E complexes.²⁷ By means of the siRNA-mediated inhibition of 4E-BP1 expression it was found that this molecule enhances ATRA-dependent up-regulation of p21(Waf1/Cip1), a protein that plays a key role in the induction of retinoid-dependent responses, functioning as a translational repressor.²⁷

Xeroderma pigmentosum group A-binding protein 2 (XAB2) is involved in pre-mRNA splicing, transcription and in transcription-coupled DNA repair, essential for embryogenesis. The knockdown of XAB2 by siRNAs increases ATRA dependent differentiation of HL-60,²⁸ suggesting that XAB2 is a component of the RAR α cells co-repressor complex with an inhibitory effect on ATRA-induced differentiation.

By means of siRNA based procedures it was also possible to analyze the specific role of transcription factors up-regulated by ATRA during the differentiation process. It was reported that the reduced expression of PU.1 by means of its specific siRNA blocks ATRA-induced neutrophil differentiation of APL-derived cells.²⁹

SiRNA technology was also used to study the role of the PML component of the fusion protein characterizing APL. Specific knockdown of PML3, a member of the PML family of cell-growth and tumor suppressor, that activates Cdk2/cyclin kinase activity, indicates a direct role for this protein in the control of centrosome duplication and genome stability.³⁰

Finally, depletion of SUMO-3 expression markedly

reduces the number of PML-containing nuclear bodies and their integrity, showing that this protein is essential for PML localization and offering new insight into the patho-biochemistry of APL.³¹

Inositide-related molecules in differentiation of APL-derived cells

Different groups of investigators, including ours, have demonstrated that agonists-induced granulocytic differentiation of APL-derived cells is accompanied by increased expression and activity of several inositide-related signal transduction enzymes as protein kinase C (PKC), PI3K and phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC).

The serine/threonine kinases family of PKC mediates a wide number of intracellular functions in different cell types. In particular, PKCs play a key role in regulating the response of hematopoietic cells to both physiological and pathological inducers of proliferation and differentiation.³² Furthermore, modifications of specific PKC isotypes activity and subcellular distribution have been described by several authors during ATRA-induced granulocytic differentiation of the APL-derived HL-60 cell line.^{33, 34} In addition, inhibition of PKC activity induces several caspases to play a crucial role in the initiation and execution of apoptosis in both primary and derived APL cells.³⁵ Recently, PKC- δ was reported to be activated after ATRA-induced differentiation of both NB4 and HL-60 and its inhibition abrogated ATRA-induced differentiation.³⁶

Proteins of the PI3K family phosphorylate at the D-3'-OH position of the myo-inositol ring of phosphoinositides leading to produce 3-phosphoinositides, second messengers whose downstream effects are implicated in many processes including regulation of cell cycle, cell transformation, vesicle transport and reorganization of cytoskeleton.³⁷ A functional role of PI3K activity in neutrophil-like differentiation of HL-60 cells has been reported.^{18, 38} In particular, antisense nucleotides strategies to suppress the expression of PI3K regulatory subunit p85 lead to a strong inhibition of ATRA-mediated differentiation of APL precursors.³⁸ In addition, the ATRA induced up-regulation of PI3K γ expression and activity as well as of MAPK are both important for differentiation of NB4 cells, suggesting that additive effects of PI3K and MAPK activities are necessary to promote granulocyte differentiation.³⁹

PLCs catalyze the hydrolysis of phosphoinositides to second messenger molecules that mediate a variety

of cellular processes including trans-membrane signaling by numerous cell surface receptors.⁴⁰ Production of lipid-derived second messengers also occurs in the cell nucleus, which possesses an autonomous signaling system responsive to external stimuli.⁴¹ Accordingly, a number of evidence indicates that expression and activity of diverse PLCs isoforms are specifically modulated in both cell and nuclear compartments of differentiating cells^{41, 42} and play crucial roles in agonist induced differentiation of APL derived precursors.⁴³

Role of PLC- β 2 in agonists-induced granulocytic maturation of APL-derived cell lines

Among the 13 different isozymes of the PLC family, PLC- β 2, firstly isolated from a HL-60 cDNA library, is expressed predominantly in cells of haematopoietic origin.⁴⁰ Its sequence contains a number of functional regions, including a PH-domain that binds to polyphosphoinositides and to cytoskeleton proteins. By means of its catalytic site, corresponding to the highly conserved X and Y domains, PLC- β 2 hydrolyzes phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) generating the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). The long carboxyl-terminal region is involved in the G α q mediated activation of the catalytic domains and contains a nuclear localization signal.⁴⁰

PLC- β 2 is highly expressed in neutrophils, according to the role that this protein plays in leukocyte signaling and host defences.⁴⁴ PLC- β 2 is activated in murine neutrophils after stimulation with fMLP and its activation leads to the production of bactericidal reactive oxygen intermediates.⁴⁴ On the other hand, a deficiency of PLC- β 2 induces an impairment of inflammation-related major functions of neutrophils, resulting in a significant reduction of chemoattractant-induced inositol phosphates accumulation, intracellular Ca²⁺ levels and superoxide production.⁴⁴

PLC- β 2 as a marker of the overcoming of the tumoral myeloid precursors differentiation blockade

Despite PLC- β 2 is greatly expressed in neutrophil of peripheral blood, this enzyme is almost absent in primary blasts purified from the bone marrow of patients bearing APL.⁴⁵ The treatment of APL-derived tumoral

promyelocytes with micromolar doses of ATRA strongly increases the expression of PLC- β 2.⁴⁵ In particular, the levels of PLC- β 2 expressed by APL blasts after ATRA treatment strikingly correlate with the responsiveness of the APL patients to retinoid-based therapies,⁴⁵ representing a prognostic factor for this leukemia.

The up-regulation of PLC- β 2 also characterizes differentiation of primary CD34⁺ hematopoietic progenitors along the granulocytic lineage but not the ATRA treatment of AML-M2 derived blasts,⁴⁵ indicating that this protein is a marker to specifically monitor maturation of normal and malignant myeloid progenitors along the neutrophil lineage.

A low but significant dose dependent increase of PLC- β 2 expression was also found when APL-derived cells were treated with ATO at differentiating concentrations and this event was particularly evident in a NB4-derived clone only partially responsive to ATRA treatment.⁴⁶ In addition, differentiating doses of ATRA and ATO cooperate to induce differentiation and PLC- β 2 expression, in both ATRA sensitive and partially resistant cells.⁴⁶

As above reported, PML/RAR α -bound co-repressors are released from DNA after treatment of APL cells with both ATRA and ATO, leading to the activation of genes repressed by fusion protein.¹ This suggests that, in APL cells, the reduced expression of PLC- β 2, whose gene is located on chromosome 15, involved in the t(15;17) translocation, may be related to the presence of the fusion protein. The increased expression of PLC- β 2, induced by both ATRA and ATO,⁴⁶ may be related indeed to the removal of the fusion protein that constitutes a common step of the differentiation pathways activated by the two agonists. Therefore, the increase of PLC- β 2 expression may be induced by different molecules able to promote the overcoming of the differentiation block of APL cells. In addition, PLC- β 2 may be useful to determine the efficiency of new drugs in releasing the block of gene transcription that characterizes acute promyelocytic leukemia.

To investigate a possible role of PLC- β 2 in promoting and/or improving the agonist induced maturation of APL derived cells, this protein was positively and negatively modulated during differentiation treatment with ATRA and ATO of both HL-60 and NB4 cells. No effect on differentiation levels were found,⁴⁶ indicating that, even though PLC- β 2 expression closely correlates with the differentiation levels

reached by APL-derived cells induced to complete their differentiation plan, it is not able to activate the maturation machinery driving the precursors to the neutrophil-like stage.

Silencing of PLC-β2 mRNA reduces the migration capability and cell cycle progression of tumoral myeloid precursors

It is well known that PLCs are key molecules in the regulation of several aspects of cell motility.⁴⁷ Downstream to PLC recruitment, cytoskeleton reorganization may occur following changes of the pool of inositol lipids, which are able to regulate actin assembly at several levels by interacting with the lipid binding domains of a variety of cellular proteins.⁴⁸ In this context, actin cytoskeleton may play important roles in the profound rearrangements of the cell morphology that occur in differentiation of granulocytes and in functional responses of mature neutrophils.⁴⁹

The use of specific siRNAs to counteract the ATRA-induced increase of PLC-β2 allowed to establish that this PLC isozyme, even if ineffective on phenotypical differentiation, affects the differentiation-related motility of NB4 cells.⁴³ The use of U-73122, an inhibitor of PLC activity highly specific for PLC-β2, supports a key role of PLC-β2 activity in the acquisition of the migratory capability of differentiating tumoral promyelocytes.⁴³

In myeloid cells, as in a number of different cell models, specific PLC isoforms regulate crucial phases of the cell cycle. In particular, the serine phosphorylation of nuclear PLC-β1, occurring at the G₂/M and late G₁ phases, seems to be necessary for the progression of the HL-60 promyelocytic cells through the cell cycle.⁵⁰ In the same cell model, the DAG generated by nuclear PLC activity is responsible for activating nuclear PKC during the late G₂ phase, which is required for the entry of cells into mitosis.⁵¹

The analysis of the cell cycle distribution of differentiating NB4 cells revealed that the over-expression of PLC-β2 promotes the accumulation of control cells in the S phase and counteracts the increase of cells in the G₀/G₁ phases induced by ATRA treatment.⁴³ Accordingly, cells are unable to proceed from the G₀/G₁ to S and G₂/M phases when PLC-β2 expression is inhibited by means of specific siRNAs and its activity is down-modulated by using the specific U-73122 inhibitor.⁴³ No effects on the expression and the activity of cyclins and cyclin kinases are induced by modulation of PLC-β2,⁴³ suggesting that other path-

ways relocate differentiating promyelocytes along the cell cycle.

In differentiating APL-derived promyelocytes, PLC-β2 and its preferred substrate PIP₂ interact with the actin component of cytoskeleton and this association seems to be mediated directly by PIP₂ via PLC-β2 phosphoinositide-binding domains.⁴³ The interaction of PLC-β2 with actin is also mediated by PH domain that allows the enzyme to approach its actin-associated substrates.⁴³

A number of studies have demonstrated that PIP₂ appears a critical regulator of actin polymerization since it up-regulates the activity of many proteins promoting actin assembly and down-regulates proteins that inhibit actin assembly or promote its disassembly.⁴⁸ Through the interaction with a number of cytoskeleton proteins, the phosphoinositides, in addition to their classical roles in signal transduction, play important functions in the regulation of cell and nuclear architecture.⁵²

Based on phosphoinositide-related mechanisms, PLC-β2 may modulate the amount of PIP₂ associated to actin and, therefore, cytoskeleton organization of differentiating tumoral promyelocytes. The resulting modulation of the phosphoinositide pool associated to cytoskeleton may be at the basis of the role of PLC-β2 in modulating migration and cell cycle progression of differentiating promyelocytes, events that both require profound reorganization of cell architecture.

Role of Vav1 in agonists-induced maturation of APL promyelocytes

Of the Vav family, Vav1 is expressed exclusively in hematopoietic cells and contains an array of structural motifs that allow it to play a role in several distinct cell functions, like proliferation, maturation, cytoskeleton reorganization, regulation of gene expression and apoptosis.⁵³ The Vav1 domains include a *dbl* homology (DH) region, which a guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity, a Pleckstrin-Homology (PH) domain, interacting with phosphoinositides, two Src-Homology 3 (SH3) domains that flank on a Src-homology (SH2) domain, mediating protein-protein interactions and a Calponin-Homology (CH) domain, that functions as an actin-binding domain.⁵³ To date, the best known function of Vav proteins is their role as guanine nucleotide exchange factors and activators of the Rho/Rac/CDC42 family of small GTPases and

the distinctive functional feature of Vav1 is that its catalytic activity is modulated by the phosphorylation on tyrosine residue/s.⁵² GEF activity of Vav1 seems to be directly dependent on inositol lipids, since the binding of PIP₂ to its PH domain results in the inability of Vav1 to undergo optimal tyrosine phosphorylation. The substitution of PIP₂ with 3-phosphoinositides, resulting by PI3K activity, allows to Vav1 tyrosine phosphorylation.⁵³

In the last few years, it has been suggested that some functions of Vav1 in hematopoietic cells are independent from its GEF activity. In particular, Vav1 seems to be involved in the control of gene expression *via* interactions with chromatin remodelling and/or transcriptional proteins.⁵⁴ It is reported that Vav1 associates with the ku70 component of the DNA-dependent protein kinase complex, with homeobox transcription factors and with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C.⁵⁴ In addition, inside the nucleus of basophilic leukemia cells it was reported that Vav1 is part of a transcriptionally active complex that binds the NFAT binding site of the IL-2 promoter playing indeed a role as adaptor protein involved in regulation of protein phosphorylation or in the assembly of transcriptional complexes.⁵⁵

Stimulation of chemoattractant receptors in non-adherent neutrophils induces a complex sequence of events: actin reorganization, shape changes, development of polarity and reversible adhesion, all culminating in chemotaxis.⁵⁶ The complex signaling mechanisms that regulate neutrophil migration are well studied and Vav1 appears to be a major point of the inhibitory crosstalk between adhesion receptors and cytokine receptors.⁵⁶ In particular, the activity of Vav1 as GEF for Rac2 is inhibited in adherent cells, possibly due to the activation by adhesion of one or more tyrosine phosphatase responsible of de-phosphorylating Vav1.⁵⁶ On the other hand, experiments performed with Vav1^{-/-} mice demonstrated that neutrophil motility *in vitro* and neutrophil mobilization into peripheral blood *in vivo* induced by FMLP were significantly reduced, as well as the generation of filamentous actin.⁵⁷ Integrin regulation of neutrophils is also essential for appropriate adhesion and transmigration into tissues. Using Vav1/Vav3-deficient neutrophils, it has been demonstrated that Vav proteins are required for multiple β 2 integrin-dependent functions, including sustained adhesion, spreading, and complement-mediated phagocytosis.⁵⁸ Vav1 is also implicated in regulating oxidative burst in neutrophils acti-

vated by fMLP.^{57, 59} In addition, a recent report suggests the intriguing possibility that Vav1 could coordinate Rac and p67phox activation during NADPH oxidase assembly in reconstituted CHO cells, although Vav1-deficient neutrophils and macrophages show no obvious defects in reactive oxygen intermediates (ROI) production in response to a variety of stimuli.⁵⁹ Furthermore, Vav1 is also implicated in ROI production downstream of TLR4 and Fc receptors.⁵⁹ Neutrophil adhesion is important for oxidative burst induction by various pro-inflammatory agents associated with bacterial infections. In this context, integrin signaling defects in Vav1 null neutrophils have been identified, also accompanied by the absence of ROI production in these cells in response to various adhesion-dependent stimuli.⁵⁹

A functional role of Vav1 was demonstrated also in tumoral myeloid precursors. Recent data have reported the tyrosine-phosphorylation of Vav1 in HL-60 cells upon cross-linking of the human Fc γ RIIa1 (CD32), that contains an ITAM motif in its intracellular region.⁶⁰ A number of evidence indicates the involvement of Vav1 in signal transduction of cytokines or hematopoietic growth factors.⁶¹ In particular, a tyrosine-phosphorylation of Vav1 was reported in G-CSF-stimulated primary human acute myelogenous leukemic cells.⁶¹

Developmental roles of Vav1 have been described for immune cells in Vav-deficient mice, in which it has been reported that Vav^{-/-} immature B and T cells fail to complete their maturation and activation.⁶² Even if an increase of Vav1 expression is observed when normal CD34⁺ hematopoietic progenitors are treated with a cytokine cocktail promoting granulocytic differentiation,⁶³ indicating that an adequate amount of Vav1 has to be achieved along with neutrophil maturation, no evidence indicates for this protein a role in modulating maturation of non-lymphoid cells.

The silencing of Vav1 mRNA counteracts the ATRA-induced maturation of tumoral myeloid precursors

At variance with neutrophils from peripheral blood, that are characterized by a great expression of Vav1, tumoral promyelocytic cells blocked at different steps of their neutrophil differentiation process show variable levels of this protein.⁶³ The differentiating treatment with ATRA induces a significant increase of the expression of Vav1 in the APL-derived cell lines HL-60 and NB4 as well as in primary blasts obtained from bone marrow of APL patients.⁶³

In APL-derived promyelocytes, at variance with normal myeloid precursors, an adequate amount of Vav1 is needed to completion of the maturation process. In fact, when Vav1 is down-modulated during the differentiation treatment with ATRA by means of specific siRNAs, to counteract the increase of the protein induced by this agonist, a significant decrease of the maturation level is reached by treated cells.⁶³

Macroarray analysis performed on differentiating HL-60 cells allowed to assess that down-modulation of Vav1 by silencing its specific mRNA inhibits the expression of 8 genes encoding for cytokine and/or growth factors, induced by ATRA during the maturation process.⁶³ The same results were obtained when tyrosine phosphorylation of Vav1 was specifically inhibited,⁶³ indicating that tyrosine-phosphorylation of this protein plays a crucial role in regulating ATRA-induced maturation of tumoral myeloid precursors along the granulocytic lineage.

Vav1 promotes neutrophil maturation of APL-derived cells

Experiments in which the amount of Vav1 was up-regulated allowed to establish that this protein may be directly involved in the completion of maturation program of APL-derived promyelocytes. It was reported that the over-expression of Vav1 in the early promyelocytes HL-60 induces a significant increase of CD11b expression.⁶³ An additional increase of granulocytic differentiation level was found when Vav1 was over-expressed in both HL-60 and NB4 cells induced to differentiate with ATRA.⁶³ Nevertheless, up-regulation of Vav1 is not sufficient *per se* to induce the achievement of a more differentiated nuclear morphology, which also requires tyrosine phosphorylation of this protein.⁶³

In the APL-derived HL-60 cell line, a number of protein complexes including Vav1 was identified after ATRA treatment, that seems to be responsible of recruiting and activating this protein during the maturation process.⁶⁴ In particular, a Cbl/Vav1 association was found in the cytoplasm and a SLP-76/Vav1 containing complex was observed in the nuclear compartment of differentiated cells,⁶⁴ indicating the existence of a compartmentalized association between these molecules during granulocytic differentiation of HL-60 cells, possibly related to a different role of Vav1 in the different cell compartments.

Vav1 may regulate actin cytoskeleton/nucleoskeleton during ATRA treatment of APL-derived cells

In both APL-derived NB4 and HL-60 cells, as in other cell types,⁵⁵ Vav1 also shows an intranuclear localization and a large increase of tyrosine-phosphorylated Vav1 occurs in nuclei of differentiated cells.⁶³ Syk, a tyrosine kinase interacting with the SH2 domain of Vav1, seems to be responsible to phosphorylate at least one of Vav1 tyrosine residues in differentiating APL cells.⁶⁴ A pharmacological reduction of the Syk-dependent tyrosine phosphorylation of Vav1 impairs the modifications of nuclear morphology that occur during granulocytic differentiation, indicating that tyrosine-phosphorylated Vav1 plays a crucial role in regulating the nucleoskeleton reorganization of ATRA treated APL derived promyelocytes.⁶⁴

The best known function of tyrosine phosphorylated Vav1, GEF activity, which causes GTPases-related cytoskeletal changes, seems not to be involved in the ATRA-induced morphological changes in HL-60,⁶⁵ indicating that alternative mechanisms need to be activated by Vav1 to promote cytoskeleton changes of differentiating promyelocytes.

In ATRA treated HL-60 cells, tyrosine-phosphorylated Vav1 associates with the SH2 domains of the p85 regulatory subunit of PI3K, regulating, in both whole cell and nucleus, the activity of this protein and its interaction with actin.⁶⁵ When Vav1/PI3K interaction and the related PI3K activity are impaired, by inhibiting Syk-dependent tyrosine phosphorylation of Vav1, the phenotypical differentiation of ATRA-treated HL-60 cells is compromised,⁶⁵ confirming the notion that PI3K activity is crucial for granulocytic differentiation. In view of the fact that, when the Vav1-dependent PI3K/actin interaction is abrogated, the recovery of 3-phosphoinositides is strongly reduced,⁶⁵ it is conceivable that the interaction of PI3K with actin may permit the use of its cytoskeleton-associated substrates. This results in modifications of the phosphoinositide pool, that as above reported, play a crucial role in modulating cytoskeleton reorganization.

Concluding remarks

Retinoids and their nuclear receptors activate different signal transduction pathways that cooperate to promote the completion of maturation along the neutrophil lineage of tumor promyelocytes. In APL-derived

cells, a number of ATRA modulated signaling molecules appears involved in the acquisition of a phenotypically and functionally mature profile.

The use of small interfering RNAs, that selectively suppress the expression of specific proteins, represents a new valuable tool in the study of APL, since it allows establishing the role of the components of signaling mechanisms activated by ATRA target genes. In addition, it will help in the identification of molecules useful for the development of new therapeutics approaches to APL.

References

- Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Am Soc Hematol Educ Program* 2006;156-61.
- Douer D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:357-67.
- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008;111:2505-15.
- Breitman TR, Collins SJ, Keene BR. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 1981;57:1000-4.
- Ohnishi K. PML-RAR inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia. *Int J Clin Oncol* 2007;12:313-7.
- Tallman MS. Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:57-65.
- Zhou GB, Zhang J, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Treatment of acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;362:959-71.
- Lo-Coco F, Ammatuna E, Noguera N. Treatment of acute promyelocytic leukemia with gentuzumab ozogamicin. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006;4:57-62.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 1977;270:347-9.
- Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 1991;77:1080-6.
- Barber N, Belov L, Christopherson RI. All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. *Leuk Res* 2008;32:315-22.
- Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X *et al*. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As2O3 exerts dose dependent dual effects on APL cells. *Blood* 1997;89:3345-53.
- Lee KH, Chang MY, Ahn JI, Yu DH, Jung SS, Choi JH *et al*. Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;296:1125-33.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK *et al*. RNA interference: biology, mechanism and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:657-85.
- Zhao KW, Li X, Zhao Q, Huang Y, Li D, Peng ZG, *et al*. Protein kinase C delta mediates retinoic acid and phorbol myristate acetate-induced phospholipid scramblase 1 gene expression: its role in leukemic cell differentiation. *Blood* 2004;104:3731-8.
- Pitha-Rowe I, Hassel BA, Dmitrovsky E. Involvement of UBE1L in ISG15 conjugation during retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia. *J Biol Chem* 2004;279:18178-87.
- Song JJ, Lee YJ. Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop. *J Cell Biol* 2005;170:61-72.
- Matkovic K, Brugnoli F, Bertagnolo V, Banfic H, Visnjic D. The role of the nuclear Akt activation and Akt inhibitors in all-trans-retinoic acid-differentiated HL-60 cells. *Leukemia* 2006;20:941-51.
- Hashimoto K, Sonoda Y, Yamakado M, Funakoshi-Tago M, Yoshida N, Rokudai A *et al*. C/EBPalpha inactivation in FAK-overexpressed HL-60 cells impairs cell differentiation. *Cell Signal* 2006;18:955-63.
- Xia L, Wurmbach E, Waxman S, Jing Y. Upregulation of Bfl-1/A1 in leukemia cells undergoing differentiation by all-trans retinoic acid treatment attenuates chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Leukemia* 2006;20:1009-16.
- Tabe Y, Konopleva M, Kondo Y, Contractor R, Tsao T, Konoplev S *et al*. PPARgamma-active triterpenoid CDDO enhances ATRA-induced differentiation in APL. *Cancer Biol Ther* 2007;6:1967-77.
- Rizzi M, Tschan MP, Britschgi C, Britschgi A, Hügli B, Grob TJ *et al*. The death-associated protein kinase 2 is up-regulated during normal myeloid differentiation and enhances neutrophil maturation in myeloid leukemic cells. *J Leukoc Biol* 2007;81:1599-608.
- Lunghi P, Tabilio A, Lo-Coco F, Pellicci PG, Bonati A. Arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibition synergize to induce apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* 2005;19:234-44.
- Wang HR, Gu CH, Zhu JY, Han JY, Zhong H, Chen FY *et al*. PNAS-2: a novel gene probably participating in leukemogenesis. *Oncology* 2006;71:423-9.
- Hattori H, Zhang X, Jia Y, Subramanian KK, Jo H, Loison F *et al*. RNAi screen identifies UBE2D3 as a mediator of all-trans retinoic acid-induced cell growth arrest in human acute promyelocytic NB4 cells. *Blood* 2007;110:640-50.
- Ozpolat B, Akar U, Steiner M, Zorrilla-Calancha I, Tirado-Gomez M, Colburn N *et al*. Programmed cell death-4 tumor suppressor protein contributes to retinoic acid-induced terminal granulocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Res* 2007;5:95-108.
- Kannan-Thulasiraman P, Dolniak B, Kaur S, Sassano A, Kalvakolanu DV, Hay N *et al*. Role of the translational repressor 4E-BP1 in the regulation of p21(Waf1/Cip1) expression by retinoids. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:983-9.
- Ohnuma-Ishikawa K, Morio T, Yamada T, Sugawara Y, Ono M, Nagasawa M *et al*. Knockdown of XAB2 enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in all-trans retinoic acid-sensitive and -resistant cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1019-29.
- Mueller BU, Pabst T, Fos J, Petkovic V, Fey MF, Asou N *et al*. ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood* 2006;107:3330-8.
- Xu ZX, Timanova-Atanasova A, Zhao RX, Chang KS. PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol Cell Biol* 2003;23:4247-56.
- Fu C, Ahmed K, Ding H, Ding X, Lan J, Yang Z *et al*. Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. *Oncogene* 2005;24:5401-13.
- Podar K, Raab MS, Chauhan D, Anderson KC. The therapeutic role of targeting protein kinase C in solid and hematologic malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16:1693-707.
- Wu XZ, Shao GY, Chen SR, Huang ME, Wang ZY. Protein kinase C in the promyelocytic leukemia cell differentiation of granulocytes. *Chin Med J (Engl)*. 1991;104:32-5.
- Zauli G, Visani G, Bassini A, Caramelli E, Bertolaso L, Bertagnolo V *et al*. Nuclear translocation of protein kinase C-alpha and -zeta isoforms in HL-60 cells induced to differentiate along the granulocytic lineage by all-trans retinoic acid. *Br J Haematol* 1996;93:542-56.
- Amin HM, Ergin M, Denning MF, Quevedo ME, Alkan S. Characterization of apoptosis induced by protein kinase C inhibitors and its modulation by the caspase pathway in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;110:552-62.

36. Kambhampati S, Li Y, Verma A, Sassano A, Majchrzak B, Deb DK *et al.* Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem.* 2003;278:32544-51.
37. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997;387:673-6.
38. Bertagnolo V, Neri LM, Marchisio M, Mischiati C, Capitani S. Phosphoinositide 3-kinase activity is essential for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cell. *Cancer Res* 1999;59:542-6.
39. Scholl S, Bondeva T, Liu Y, Clement JH, Höffken K, Wetzker R. Additive effects of PI3-kinase and MAPK activities on NB4 cell granulocyte differentiation: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008 Feb 21. [Epub ahead of print]
40. Katan M. New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward. *Biochem J* 2005;391:e7-9.
41. Manzoli L, Martelli AM, Billi AM, Faenza I, Fiume R, Cocco L. Nuclear phospholipase C: involvement in signal transduction. *Prog Lipid Res* 2005;44:185-206.
42. Bertagnolo V, Marchisio M, Capitani S, Neri LM. Intracellular translocation of phospholipase C beta2 during HL-60 myeloid differentiation. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;235:831-7.
43. Brugnoli F, Bavelloni A, Benedusi M, Capitani S, Bertagnolo V. PLC-beta2 activity on actin-associated polyphosphoinositides promotes migration of differentiating tumoral myeloid precursors. *Cell Signal* 2007;19:1701-12.
44. Wu D, Huang CK, Jiang H. Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. *J Cell Science* 2000;113:2935-40.
45. Bertagnolo V, Marchisio M, Pierpaoli S, Colamussi ML, Brugnoli F, Visani G *et al.* Selective up-regulation of phospholipase C-2 during granulocytic differentiation of normal and leukemic haematopoietic progenitors. *J Leukoc Biol* 2002;71:957-65.
46. Brugnoli F, Bovolenta M, Benedusi M, Miscia S, Capitani S, Bertagnolo V. PLC-beta2 monitors the drug-induced release of differentiation blockade in tumoral myeloid precursors. *J Cell Biochem* 2006;98:160-73.
47. Kölsch V, Charest PG, Firtel RA. The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci* 2008;121:551-9.
48. Hilpela P, Vartiainen MK, Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;282:117-63.
49. Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:220-8.
50. Lukinovic-Skudar V, Donlagic L, Banfic H, Visnjic D. Nuclear phospholipase C-beta1b activation during G2/M and late G1 phase in nocodazole-synchronized HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1733:148-56.
51. Sun B, Murray NR, Fields AP. A role for nuclear phosphatidylinositol-specific phospholipase C in the G2/M phase transition. *J Biol Chem* 1997;272:26313-7.
52. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006;443:651-7.
53. Bustelo XR. Regulation of Vav proteins by intramolecular events. *Front Biosci* 2002;7:24-30.
54. Katzav S. Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood* 2004;103:2443-51.
55. Houliard M, Arudchandran R, Regnier-Ricard F, Germani A, Gisselbrecht S, Blank U *et al.* Vav1 Is a component of transcriptionally active complexes. *Exp Med* 2002;195:1115-27.
56. Zhao T, Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *J Clin Invest* 2003;112:1732-40.
57. Kim C, Marchal CC, Penninger J, Dinayer MC. The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol* 2003;171:4425-30.
58. Gakidis MA, Cullere X, Olson T, Wilsbacher JL, Zhang B, Moores SL *et al.* Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J Cell Biol* 2004;166:273-82.
59. Ming W, Li S, Billadeau DD, Quilliam LA, Dinayer MC. The Rac effector p67phox regulates phagocyte NADPH oxidase by stimulating Vav1 guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell Biol* 2007;27:312-23.
60. Rouard H, Tamasdan S, Fridman WH, Teillaud JL. Vav and SLP-76 recruitment by cross-linking of FcgammaRIIa1 in promyelocytic HL-60 cells. *Immunol Lett* 1999;68:347-53.
61. Yuo A, Kitagawa S, Iki S, Yagisawa M, Inuo EK, Mimura T *et al.* Tyrosine phosphorylation of Vav protooncogene product in primary human myelogenous leukemic cells stimulated by granulocyte colony-stimulating factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:677-85.
62. Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, Faccio R, Brown T, Hoog J *et al.* Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med* 2003;198:1595-608.
63. Bertagnolo V, Brugnoli F, Mischiati C, Sereni A, Bavelloni A, Carini C *et al.* Vav promotes differentiation of human tumoral myeloid precursors. *Exp Cell Res* 2005;306:53-63.
64. Bertagnolo V, Marchisio M, Brugnoli F, Bavelloni A, Boccafogli L, Colamussi ML *et al.* Requirement of tyrosine-phosphorylated Vav for morphological differentiation of all-trans-retinoic acid-treated HL-60 cells. *Cell Growth Differ* 2001;12:193-200.
65. Bertagnolo V, Brugnoli F, Marchisio M, Celeghini C, Carini C, Capitani S. Association of PI 3-K with tyrosine phosphorylated Vav is essential for its activity in neutrophil-like maturation of myeloid cells. *Cell Signal* 2004;16:423-33.

Vav1 Modulates Protein Expression During ATRA-Induced Maturation of APL-Derived Promyelocytes: A Proteomic-Based Analysis

Valeria Bertagnolo,[†] Silvia Grassilli,[†] Alberto Bavelloni,[‡] Federica Brugnoli,[†] Manuela Piazzini,[‡] Giovanni Candiano,[§] Andrea Petretto,^{||} Mascia Benedusi,[†] and Silvano Capitani^{*†,⊥}

Signal Transduction Unit-Laboratory of Cell Biology, Section of Human Anatomy, Department of Morphology and Embryology, University of Ferrara, Italy, Laboratory of Cell Biology and Electron Microscopy, IOR, Bologna, Italy, Laboratory on Pathophysiology of Uremia, G. Gaslini Children Hospital, Genova, Italy, Mass Spectrometry Core Facility, G. Gaslini Children Hospital, Genova, Italy, MIUR ICSI (Interdisciplinary Center for the Study of Inflammation), University of Ferrara, Italy

Received December 21, 2007

Overexpression of Vav1 promotes the overcoming of the differentiation blockade that characterizes acute promyelocytic leukemia cells. At variance, down-modulation of Vav1 prevents ATRA-induced maturation, and in particular, the inhibition of its tyrosine phosphorylation prevents the neutrophil differentiation-related changes of cell morphology. These findings allowed to identify Vav1 as a crucial protein in the ATRA-dependent differentiation of tumoral promyelocytes. By means of a proteomic approach, here we have investigated a possible role for Vav1 in modulating protein expression during ATRA treatment of tumoral promyelocytes. We have performed high-resolution 2-DE coupled with mass spectra analysis of HL-60 and NB4 promyelocytic cell lines induced to differentiate with ATRA when the amounts or the tyrosine phosphorylation of Vav1 were forcedly reduced. We have found that the down-regulation of Vav1 affects the expression level of a number of proteins, including cell cycle/apoptosis- and cytoskeleton-related proteins. In particular, the expression of 14-3-3 ϵ , α -enolase, α -tubulin and splice isoform 2 of α 3 proteasome subunit changed as a consequence of the down-modulation of Vav1 during the differentiation of both HL-60 and NB4 cell lines, suggesting that these proteins may constitute a common part of the ATRA-induced pathway during maturation of APL-derived promyelocytes. These results indicate an unprecedented role for Vav1 in the maturation of myeloid cells as a regulator of protein expression.

Keywords: APL-derived cell • ATRA • Proteomic analysis • Vav1 • protein expression

1. Introduction

Several studies demonstrate that retinoids, biologically active forms of Vitamin A, are involved in the regulation of proliferation and differentiation of a variety of cell types, including embryonic stem cells, bone progenitor cells and cells from solid and liquid carcinomas.¹⁻³ In particular, it is known that ATRA is able to promote granulocytic differentiation of APL blasts *in vivo*⁴⁻⁶ and of myeloid cell lines *in vitro*.⁷⁻⁹

In recent years, our research group has made significant progresses toward the detection of key intracellular signaling molecules that mediate the differentiating effects of ATRA.

Among these, Vav1, that correlates with the differentiation of hematopoietic cells, even if with different roles in the diverse lineages,¹⁰⁻¹³ seems to play a crucial role in the overcoming of the maturation blockade of APL promyelocytes.

In particular, our previous data demonstrated that in the APL-derived HL-60 and NB4 cell lines, well-studied models of neutrophil differentiation induced by retinoids, Vav1 increases in amount and tyrosine phosphorylation level during ATRA-induced granulocytic differentiation.¹⁴ We have also demonstrated that the down-modulation of Vav1 prevents maturation, while its overexpression promotes differentiation of tumoral promyelocytes, indicating that Vav1 is a key molecule in ATRA-dependent myeloid maturation.¹⁴

The best known function of Vav1 is a tyrosine phosphorylation-regulated guanine nucleotide exchange activity for small G proteins. Because of the presence of diverse domains inside its structure, Vav1 may interact with a number of different molecules, in both cytoplasm and nuclear compartments, playing additional roles as adaptor/regulator protein.^{12,15}

* To whom correspondence should be addressed. Silvano Capitani, Signal Transduction Unit/Laboratory of Cell Biology, Section of Human Anatomy-Department of Morphology and Embryology, Via Fossato di Mortara, 66, 44100 Ferrara, Italy. Phone: +39 0532 455571. Fax: +39 0532 207351. E-mail: cps@dns.unife.it.

[†] Department of Morphology and Embryology, University of Ferrara.

[‡] Laboratory of Cell Biology and Electron Microscopy, IOR.

[§] Laboratory on Pathophysiology of Uremia, G. Gaslini Children Hospital.

^{||} Mass Spectrometry Core Facility, G. Gaslini Children Hospital.

[⊥] MIUR ICSI (Interdisciplinary Center for the Study of Inflammation), University of Ferrara.

Further data obtained in our laboratory indicate that, during granulocytic differentiation of HL-60 cells treated with ATRA, Vav1 is tyrosine-phosphorylated by Syk, an event that, even if not ended to modulate GEF activity of Vav1, seems to be essential for the changes of the nuclear shape that occur during neutrophil-like maturation of APL-derived promyelocytes.¹⁶ In this context, we have found that tyrosine-phosphorylated Vav1 appears crucial for the formation of molecular complexes including PI 3-K and actin, aimed to modulate the cytoskeleton-associated phosphoinositide pools.¹⁷

Recent data concerning the role of the multidomain protein Vav1 indicate that this molecule, also present in the nuclear compartment of both lymphoid and myeloid cells,¹⁸⁻²⁰ is part of transcriptional complexes as a facilitator of NFAT and NFkB-like transcriptional activity.^{19,20} Consistent with an effect of Vav1 on the transcriptional machinery, by means of array profiling obtained with differentiating HL-60 cells, we have demonstrated that the forced reduction of Vav1 during treatment with the agonist reduces the number of ATRA-induced genes.¹⁴

The specific aim of this study was to establish if Vav1 may have a role in modulating the expression level of the protein tools by means of which ATRA executes the maturation program of tumoral promyelocytes. For this reason, we have performed a proteomic investigation with the high-resolution 2-DE system and mass spectrometry on ATRA-treated promyelocytic cell lines in which the expression or the tyrosine phosphorylation of Vav1 were forcedly inhibited. We have found that the amount of a number of proteins, including cell cycle- and cytoskeleton-related proteins, was affected when the amount of Vav1 was reduced during the agonist-induced completion of the maturation program. These results indicate for Vav1 an unprecedented role in the maturation of myeloid cells as a regulator of protein expression.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture and Reagents. The HL-60 promyelocytic cell line (American Type Culture Collection, ATCC CCL-240, Rockville, MD) and the NB4 APL-derived cell line (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) were cultured in RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Islands, NY) supplemented with 10% FCS (Gibco Laboratories) in a 94/6% air/CO₂ atmosphere. Cells were maintained at an optimal cell density between 5×10^5 /mL and 1.5×10^6 /mL.

ATRA was purchased from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO) and the stock solution was obtained by dissolving the differentiating agent in absolute ethanol. For neutrophil-like differentiation, cells were treated with 1 μ M ATRA for 4 days.

To inhibit Syk-dependent tyrosine phosphorylation of Vav1, cells were treated for 4 days with 1 μ g/mL Piceatannol (Sigma), alone or in combination with 1 μ M ATRA, as previously reported.¹⁶

All reagents were from Sigma if not differently indicated.

2.2. Evaluation of Granulocytic Differentiation. The degree of morphological granulocytic differentiation of HL-60 and NB4 cells was monitored by means of a specific nuclear staining with DAPI and morphometrical analysis of cell nuclei, as previously reported.¹⁴

The degree of phenotypical differentiation of both cell lines was evaluated by measuring the expression level of the CD11b myeloid surface marker by direct staining with a PE-conjugated anti-CD11b antibody (Immunotech, Coulter Company, Marseille,

France), as previously reported.¹⁴ After staining, samples were analyzed by flow cytometry (FACScan, Becton-Dickinson, San José, CA) with Lysis II software (Becton-Dickinson). Data collected from 10 000 cells are reported as mean fluorescence intensity values.

2.3. RNA Interference Assays. siRNA sequences targeting the Vav1 gene (National Center for Biotechnology Information, accession number NM 5428) were synthesized by QIAGEN (QIAGEN S.p.A., Milano, Italy). The lyophilized siRNA was dissolved in sterile Suspension Buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM Hepes-KOH, 2 mM magnesium acetate, pH 7.4) to obtain a 20 μ M solution, and then oligonucleotides were heated to 90 °C for 1 min followed by 1 h at 37 °C. As a control, nonsilencing, fluorescein-labeled, duplex siRNA, purchased from QIAGEN, was used.

Exponentially growing HL-60 and NB4 cells were transfected with a mixture of all siRNA duplexes and with the nonsilencing fluorescent RNA using an electroporation procedure, as previously reported.¹⁴ Following electroporation, cells were allowed to recover in 600 μ L of RPMI culture medium with 20% FBS, and after 5 h, cells transfected with nonsilencing RNA were subjected to cytofluorimetric analysis to determine transfection efficiency that resulted to about 60%. Cells transfected with nonsilencing and silencing RNAs were then treated with ATRA and subjected to evaluation of their degree of differentiation as well as to immunochemical analysis and to the analysis of protein expression by means of 2-DE.

2.4. Immunochemical Analysis. For Western blot analysis, after washing in cold PBS and Na₃VO₄, cells were lysed in 1 \times Laemmli Buffer and 50 μ g of protein was separated on 7.5% polyacrylamide denaturing gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Life Science, Little Chalfont, United Kingdom).

For analysis of tyrosine-phosphorylated proteins, the membranes were saturated for 1 h in TBS containing 3% BSA and incubated with a specific monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (PY20, Transduction Laboratories, Lexington, KY), as previously described.¹⁴

For analysis of Vav1, the membranes were saturated for 1 h in TBS containing 0.05% Tween-20 and 5% milk, and incubated with a specific anti-Vav1 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), as previously described.¹⁴

For the analysis of α -tubulin, β -tubulin and actin, the nitrocellulose membranes were saturated and reacted with the specific monoclonal antibody (Sigma). For the analysis of α -enolase and 14-3-3 ϵ , the membranes were saturated then reacted with the specific polyclonal and monoclonal antibodies, respectively, both from Santa Cruz. All membranes were then incubated with IgG peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma) and revealed by chemiluminescence using the ECL system (PerkinElmer, Boston, MA), according to the manufacturer's instructions.

2.5. Two-Dimensional Gel Electrophoresis. 2-DE was performed essentially as described by Bavelloni et al.²¹ In particular, cells were washed with a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 250 mM sucrose, and lysed with a buffer containing 2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.8% IPG buffer, pH 3-10 (Bio-Rad, CA), benzamide and protease inhibitors, followed by heating for 30 min at 30 °C, sonication and centrifugation at 21 000g for 60 min at 4 °C. The resulting supernatant, after determination of the protein concentration by the Bradford methods (Bio-Rad, CA), was subjected to isoelectric focusing separation of proteins.

In particular, supernatant containing 600 μg of proteins was used to rehydrate 17 cm pH 3–10 and pH 4–7 IPG gel strips (Bio-Rad, CA) for 16 h at 20 °C. Focusing was then carried out using the following conditions: 500 V (30 min), 1000 V (30 min), 5000 V (60 min), 10 000 V (60 min) and 10 000 V to reach a total of 80 kVh.

After isoelectric focusing, the strips were equilibrated 2 \times 15 min with 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, 6 M urea, 30% glycerol and 2% SDS. In the first equilibration solution, 125 mM DTT was included and 250 mM iodoacetamide was added in the second equilibration step to alkylate thiols. The separation in the second dimension was performed using 1 mm thick, 12% constant vertical SDS-PAGE in Protean II apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). The strips were held in place with 0.5% agarose dissolved in a SDS/Tris/glycine running buffer and electrophoresis was carried out at constant 35 mA/gel.

After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250, according to Candiano et al.²² The stained gels were scanned using a GS-800 densitometer (Bio-Rad). Acquired maps were analyzed using the PDQuest Basic Version 8.0 software (Bio-Rad). After automated detection and matching, highly saturated or ill-defined spots were manually removed and cross-gel matching was checked and corrected when necessary. Background was subtracted, followed by protein spot localization and quantification. Intensity levels were normalized between gels by expressing the intensity of each spot in a gel as a proportion of the total protein intensity detected for the entire gel. We have considered significant a difference in intensity of 200% between spots of the two compared gels. Gels were run in triplicate.

2.6. Mass Spectrometry and Protein Identification. After the staining procedure, the gel was washed three times with water for 60 min. Spots of interest were excised using a sterile blade and placed in a 1.5 mL microtube. "In gel" digestion, essentially performed as described by Bottino et al.,²³ was carried out in 100 mM ammonium bicarbonate, 1 mM CaCl_2 , pH 8.9, 30% acetonitrile and 5 μL of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin solution overnight at 37 °C. After incubation, the supernatant was recovered and dried in a vacuum centrifuge (Savant Instrument, Inc., Farmingdale, NY), to reduce acetonitrile concentration, and 30 μL of 0.25% formic acid was added.

Mass spectrometric measurements were performed as described by Musante et al.²⁴ In particular, a LTQ linear trap mass spectrometer (Thermo Electron, San José, CA) was used, coupled with a HPLC Surveyor (Thermo Electron) and equipped with a Jupiter C18 column 250 \times 1 mm (Phenomenex, Inc., Torrance, CA). Peptides were eluted from the column using an acetonitrile gradient, 5% eluent A (0.1% formic acid in water) for 6 min followed by 5–90% eluent B (0.1% formic acid in acetonitrile) within 90 min at flow-rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. The column effluent was directed into the electrospray source. The spray voltage was 5.0 kV. The capillary of ion trap was kept at 200 °C and the applied voltage was 2.85 V.

Spectra were acquired in automated MS/MS mode: each full MS scan (in the range 400–1800 m/z) was followed by five MS/MS of the most abundant ions; mass that had been analyzed for more than two times this way was automatically taken up into an exclusion list for 30 s.

Protein identification was performed using SEQUEST software, from Thermo Electron, operating on a 10 processor computer cluster (AETHIA, Torino, Italy) and searched against an IPI Human protein database.²⁵

Peptide MS/MS assignments were filtered following the HUPPO criteria: Xcorr \geq 1.9 for the singly charged ions, Xcorr \geq 2.2 for doubly charged ions, and Xcorr \geq 3.7 for triply charged ions, peptide probability \leq 0.01, Delta Cn \geq 0.1 and Rsp \leq 4.²⁶ To identify the largest panel of peptides, the option no enzyme was used for the in silica digestion of human databases for all protein searches in gel enzymatic digestion.

2.7. Statistical Analysis. The results were expressed as means \pm standard deviations of three or more experiments performed in duplicate. Statistical analysis was performed using the two-tailed Student's *t* test for unpaired data.

3. Results

3.1. Vav1 Is Crucial for ATRA-Induced Differentiation of APL-Derived Tumoral Promyelocytes. As we have previously demonstrated, in both the HL-60 and NB4 promyelocytic cell lines, treatment with micromolar concentrations of ATRA induces an increase in amount and tyrosine phosphorylation of Vav1 (Figure 1A). The inhibition of Vav1 expression during ATRA treatment (Figure 1B) significantly reduces the phenotypical differentiation of both cell lines, measured as expression of the surface marker CD11b (Figure 1C). The specific inhibition of the Syk-dependent tyrosine phosphorylation of Vav1 during ATRA treatment (Figure 1A) does not affect the granulocytic differentiation level (Figure 1C). On the other hand, the combined administration of Piceatannol, the selective Syk inhibitor, and ATRA significantly reduced the modifications of nuclear morphology that occur during the retinoids-induced completion of the maturation program of both HL-60 and NB4 cells (Figure 1D).

3.2. Vav1 Is Involved in the Modulation of Protein Expression during ATRA-Induced Differentiation of Promyelocytic Cell Lines. Since the amount of Vav1 during ATRA treatment seems to be critical for differentiation of both HL-60 and NB4 cells, we have evaluated a possible role for this molecule in regulating protein expression during the maturation process of these two cell lines. With this aim, two-dimensional electrophoresis was used to analyze protein expression in HL-60 and NB4 cells induced to differentiate with ATRA when expression or tyrosine phosphorylation of Vav1 was down-modulated.

In preliminary experiments, we have used immobilized pH gradient gel strips with a broad pH range (3–10 linear) for first-dimensional isoelectric focusing. After Coomassie Brilliant Blue staining, software-based analysis indicated that a majority of the spots were mainly located between pH 4 and pH 7 in the horizontal axis (data not shown). Thus, for a higher resolution, we have performed the subsequent analysis using IPG strips with the pH 4–7 linear range.

Figure 2 reports representative 2-D gel images of the protein expression pattern in HL-60 (A) and NB4 (B) cells, induced to differentiate when Vav1 amount (siRNA) or tyrosine phosphorylation (Piceatannol) were down-modulated.

When the PDQuest software was used, up to 500 stained spots were detected *per gel*, and after removal of saturated and poorly reproducible zones, about 350 spots were compared to select proteins whose expression showed a significant degree of variability following the different cell treatments.

For every experimental condition, 3 different proteic maps were analyzed and 23 spots for each of the two cell lines were selected for mass spectrometry analysis. These included 3 proteins whose expression appeared constant in all samples and 20 spots that significantly changed (more than 2-fold) their

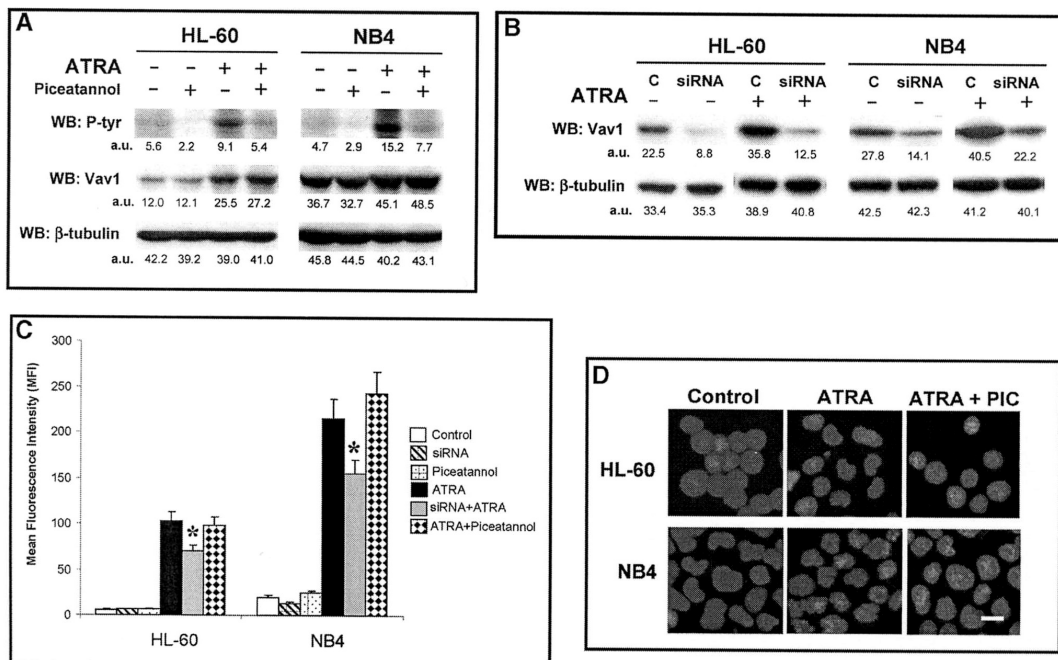


Figure 1. Vav1 in ATRA-induced differentiation of HL-60 cells. (A) Lysates from HL-60 and NB4 cells induced to differentiate along the granulocytic lineage (ATRA) in the absence (-) or presence (+) of Piceatannol were subjected to Western blot analysis with the indicated antibodies. (B) HL-60 and NB4 cells, transfected with nonsilencing (C) or silencing RNA (siRNA) and induced to differentiate with ATRA, were subjected to immunochemical analysis to evaluate Vav1 expression. The same lysates were analyzed for β -tubulin content, as internal control of equal protein amounts. Values obtained after densitometric analysis of the autoradiograms are indicated as arbitrary units (au). The data are representative of 3 separate experiments. (C) HL-60 and NB4 cells transfected with nonsilencing (C) or silencing RNA (siRNA) or treated with Piceatannol were induced to differentiate with ATRA and then analyzed by flow cytometry to evaluate their CD11b levels. The data are the mean of 3 separate experiments \pm SD. The asterisks represent statistically significant values ($p < 0.05$). (D) HL-60 and NB4 cells induced to differentiate (ATRA) in the presence of Piceatannol (PIC) were subjected to nuclear staining with DAPI. The data are representative of 3 different experiments. Bar: 10 μ m.

intensity after Vav1 down-regulation. In all the compared experimental conditions, each spot was picked-up from the gel and subjected to trypsin digestion and mass spectrometry. After analysis performed with the dedicated software and searching against the integrated IPI human database, only 12 spots for HL-60 (Figure 2A) and 12 spots for NB4 (Figure 2B) were identified.

The spots corresponding to proteins whose amount appeared constant in both HL-60 and NB4 cells and in all the experimental conditions were identified as actin (Figure 2A,B, spot 1), Calreticulin (Figure 2A,B, spot 2) and Cofilin-1 (Figure 2A,B, spot 3).

When Vav1 expression was down-modulated during the differentiation treatment, 5 proteins increased (Figure 2A, spots 4–8) and 4 proteins decreased (Figure 2A, spots 9–12) their amount in HL-60 cells (Table 1). Even if mostly different, 5 proteins increased (Figure 2B, spots 4, 6, 13–15) and 4 proteins decreased (Figure 2B, spots 9, 12, 16, 17) their expression level in NB4 cells (Table 2).

When the tyrosine phosphorylation of Vav1 was specifically inhibited by Piceatannol during ATRA treatment, only one protein, Tubulin alpha-chain (Figure 2A,B, spot 6), appears down modulated in both HL-60 and NB4 cells (Tables 1 and 2).

All the identified proteins were classified on the basis of their main functional role, and as shown in Tables 1 and 2, they include enzymes, cell cycle and apoptosis related proteins, molecules involved in protein synthesis, folding and degradation as well as cytoskeleton proteins.

In comparison to ATRA treatment, the expression of some proteins changed as a consequence of the down-modulation of Vav1 during the differentiating treatment of both HL-60 and NB4 cell lines, suggesting that they may constitute part of a common mechanism in the ATRA-induced maturation of APL-derived promyelocytes. These proteins, reported in Table 3 together with their primary functional role, include 14-3-3 protein-epsilon (Figure 2A,B, spot 4) and Tubulin alpha-chain (Figure 2A,B, spot 6), that increased their expression, and Alpha-enolase (Figure 2A,B, spot 9) and Splice isoform 2 of Proteasome subunit alpha type 3 (Figure 2A,B, spot 12) that decreased in amount. Unexpectedly, in both cell lines, the cytoskeleton protein Tubulin alpha-chain (Figure 2A,B, spot 6) appears down-modulated when Piceatannol was used during ATRA treatment to inhibit tyrosine phosphorylation of Vav1 (Table 3).

3.3. Validation of Protein Expression Profile. The validation of proteomic results was performed by means of Western blot analysis of whole lysates from HL-60 and NB4 cells induced to

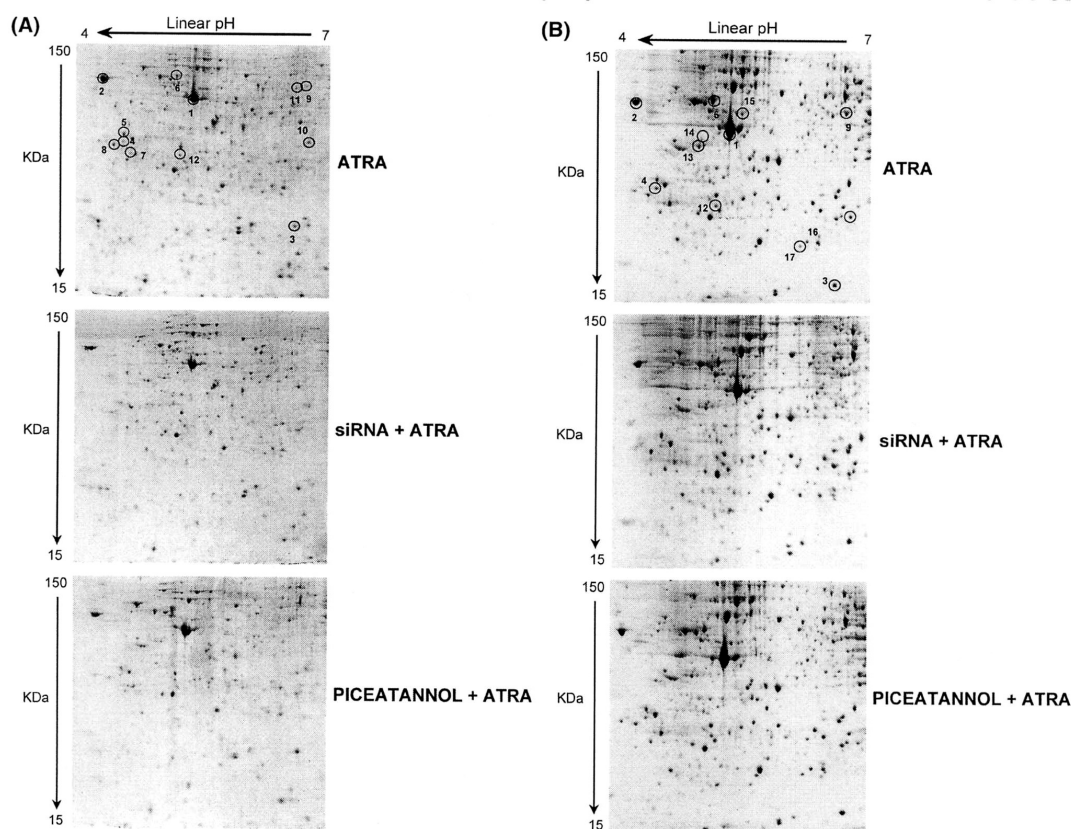


Figure 2. Effects of reduced amounts or tyrosine phosphorylation of Vav1 on protein expression in differentiating HL-60 and NB4 cells. Lysates from ATRA-treated HL-60 (A) and NB4 (B) cells transfected with nonsilencing (ATRA) or silencing RNA (siRNA+ATRA) were subjected to 2D electrophoresis using pH 4–7 strips in the first dimension and 12% polyacrylamide denaturing gel for the second dimension, separating proteins with a molecular weight ranging from 15 to 150 KDa. The same analysis was performed on lysates from HL-60 (A) and NB4 (B) cells induced to differentiate in the presence of the pharmacological inhibitor of Vav1 tyrosine phosphorylation (Piceatannol+ATRA). Spots corresponding to identified differentially expressed proteins are indicated with circles. The data are representative of 3 separate experiments.

complete their ATRA-driven maturation program in the presence of a reduced expression or tyrosine phosphorylation of Vav1. The amount of 14-3-3 protein-epsilon (14-3-3 ϵ), Tubulin alpha-chain (α -tubulin) and Alpha-enolase (α -enolase), proteins differentially expressed in both cell lines, against which commercially antibodies are available, was evaluated.

As reported in Figure 3A, ATRA treatment induced a weak decrease of 14-3-3 ϵ amount only in NB4 cells and an increased expression of α -enolase in both cell lines. With respect to their amount in ATRA-induced cells, the level of 14-3-3 ϵ increased and α -enolase decreased when the differentiating treatment was performed in the presence of a forcedly reduced amount of Vav1, recalling the expression changes observed with 2D analysis.

As a further control, the amount of actin was analyzed, and as reported in Figure 3A, it increased following ATRA treatment and was not affected by down-modulation of Vav1 during differentiation, confirming the data obtained with 2D analysis.

Since α -tubulin expression shows a peculiar behavior following Vav1 down-regulation, a Western blot analysis was

performed on lysates from HL-60 and NB4 cells induced to differentiate in the presence of reduced amount (Figure 3B) or tyrosine phosphorylation (Figure 3C) of Vav1. The results indicated that, in both cell lines, ATRA induced an increased expression of α -tubulin and confirmed the 2D data about the changes in protein level induced by Vav1 down-regulation during differentiation treatment (Figure 3B,C).

4. Discussion

It is well-known that treatment of APL cells with pharmacological concentrations of ATRA induces the release of transcriptional repression and elicits the regulation of post-transcriptional events leading to cell differentiation.²⁷ Microarray analysis performed on APL-derived cell lines identified a high number of genes whose expression is modified by ATRA treatment. However, the modest agreement among different reports suggests that only the investigation of both mRNA and protein expression may provide complete information about the role of ATRA in promoting maturation of myeloid precursors. Proteome analysis currently provides the opportunity to

Table 1. Proteins That Are Differentially Expressed at 96 h of ATRA Treatment in HL-60 Cell Line in Which Amount or Tyrosine Phosphorylation of Vav1 Was Down-Regulated, Identified by Mass Spectrometry

conditions	spot no.	protein name	Swiss-Prot accession no.	score	coverage (%)	peptide probability	peptide (hits)	function			
siRNA	Up	4	14-3-3 protein epsilon	P62258	166.39	44.70	2.30×10^{-13}	43	Cell cycle, apoptosis		
		5	Proliferating cell nuclear antigen	P12004	168.31	51.00	8.45×10^{-11}	46	Cell cycle, apoptosis		
		6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90×10^{-11}	41	Cell structure-cytoskeleton		
		7	Proteasome subunit alpha type 5	P28066	46.27	14.50	2.78×10^{-5}	9	Protein degradation		
		8	Elongation factor 1-beta	P24534	46.29	24.60	3.59×10^{-11}	34	Protein synthesis and folding		
		9	Alpha-enolase	P06733	100.33	32.10	2.22×10^{-15}	34	Enzymes		
	Down	10	Hypothetical protein FLJ25678	P00491	144.32	38.90	4.56×10^{-10}	34	Enzymes		
		11	Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	206.33	47.10	4.00×10^{-11}	51	Cell cycle, apoptosis		
		12	Splice Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type 3	P25788	30.20	12.60	1.53×10^{-6}	5	Protein degradation		
		Piceatannol	Down	6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90×10^{-11}	41	Cell structure-cytoskeleton

Table 2. Proteins That Are Differentially Expressed at 96 h of ATRA Treatment in NB4 Cell Line in Which Amount or Tyrosine Phosphorylation of Vav1 Was Down-Regulated, Identified by Mass Spectrometry

conditions	spot no.	protein name	Swiss-Prot accession no.	score	coverage (%)	peptide probability	peptide (hits)	function	
siRNA	Up	4	14-3-3 protein epsilon	P62258	166.39	44.70	2.30×10^{-13}	43	Cell cycle, apoptosis
		6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90×10^{-11}	41	Cell structure-cytoskeleton
		13	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	O60812	72.25	20.50	4.90×10^{-7}	20	Protein synthesis and folding
		14	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Q9Y3F4	150.32	42.90	4.19×10^{-12}	42	Enzymes
		15	Eukaryotic initiation factor 4A-1	P60842	154.30	40.90	5.00×10^{-9}	55	Protein synthesis and folding
	Down	9	Alpha-enolase	P06733	100.33	32.10	2.22×10^{-15}	34	Enzymes
		12	Splice Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type 3	P25788	30.20	12.60	1.53×10^{-6}	5	Protein degradation
		16	RcTPII	Q2QD09 ^a	96.26	24.10	3.76×10^{-8}	27	Enzymes
		17	Splicing factor, arg/ser rich 3	P84103	40.16	18.90	4.55×10^{-6}	9	Protein synthesis and folding
		6	Tubulin alpha-chain	P68366	138.30	27.00	9.90×10^{-11}	41	Cell structure-cytoskeleton

^aTremble accession number.

identify global changes in gene expression by directly measuring protein amount. A number of recent studies utilized this approach to evaluate protein expression during differentiation/apoptosis induced by different agonists in APL-derived cells. In particular, it was reported that ATRA modulates structural and signal transduction proteins as well as molecules involved in the different phases of protein synthesis.²⁷⁻³⁰

Our recent evidence supports the unprecedented notion that the multidomain protein Vav1 plays crucial functions in the maturation process of myeloid cells, since we have demonstrated that the down-modulation of this protein prevents and that the overexpression of Vav1 promotes the ATRA-induced differentiation of APL-derived cells.¹⁴ In particular, we have found that Vav1 is up-regulated during agonist treatment and accumulates in nuclei of differentiated HL-60 and NB4 promyelocytes, and that are blocked to different stages along the

Table 3. Proteins Differentially Expressed in Both HL-60 and NB4 Cells When Amount or Tyrosine Phosphorylation of Vav1 Was Down-Modulated

conditions	protein name	known function	
siRNA	Up	14-3-3 protein epsilon Tubulin alpha-chain	Cell cycle, apoptosis Cell structure-cytoskeleton
	Down	Alpha-enolase Splice Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type 3	Enzymes Protein degradation
Piceatannol	Down	Tubulin alpha-chain	Cell structure-cytoskeleton

granulocytic lineage and both respond to ATRA reaching however different maturation levels.^{14,16-18}

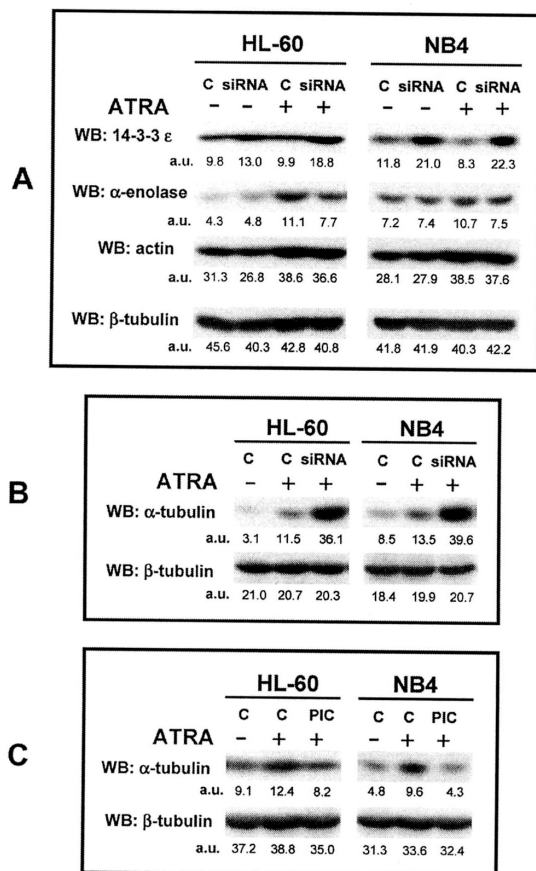


Figure 3. Validation of proteomic results by Western blot analysis. Lysates from HL-60 and NB4 cells, transfected with nonsilencing (C) or silencing RNA (siRNA) and induced to differentiate with ATRA, were subjected to immunochemical analysis with the indicated antibodies (A). HL-60 and NB4 cells induced to differentiate (ATRA) in the presence of a reduced amount (siRNA) (B) or tyrosine phosphorylation (PIC) (C) of Vav1 were subjected to Western blot analysis with an antibody directed against α -tubulin. The analysis of β -tubulin content allowed to verify the equivalence of protein amount in the different experimental conditions. Values obtained after densitometric analysis of the autoradiograms are indicated as arbitrary units (au). The data are representative of 3 separate experiments.

It has been reported that, inside the nucleus of a number of different cell lines, Vav1 participates in molecular complexes with DNA-related proteins.^{15,19,20,31} Even if the exact role of Vav1 in the nucleus has to be fully elucidated, the above-reported findings suggest a putative role of Vav1 in regulating nuclear events aiming to control DNA processing and, ultimately, protein expression.

Stemming from the above-reported considerations, the present study was devoted to establish a possible role for Vav1 in the ATRA-induced modulation of protein expression during the differentiation program of APL-derived myeloid precursors. With this aim, we have analyzed the protein profiles of ATRA-treated HL-60 and NB4 cells induced to differentiate in the presence of down-regulated Vav1.

By means of 2D electrophoresis followed by mass spectrometry, 9 proteins in HL-60 cells and, even if mostly different, 9 proteins in NB4 cells, were identified to be more than 2-fold differentially expressed when the amount of Vav1 was down-modulated during the differentiation process. They include cytoskeleton-associated and proliferation/apoptosis-related proteins as well as molecules involved in metabolism, synthesis, folding and degradation of proteins. A majority of the identified proteins are modulated only in one of the two analyzed cell lines, according to the notion that HL-60 and NB4 cells, even if both derived from patients with APL, show peculiar genotypic and phenotypic profiles.

Four of the identified proteins are differentially expressed in both cell lines, suggesting that they may constitute a common part of the signaling activated by ATRA in APL-derived promyelocytes. In particular, 14-3-3 ϵ and the cytoskeleton component α -tubulin increase their amount while the expression of α -enolase and of the splice isoform 2 of α 3 proteasome subunit decreases when the differentiation treatment of both cell lines was performed in the presence of a reduced amount of Vav1.

A recent study performed by means of proteomic analysis indicated that ATRA induces down-modulation of 14-3-3 proteins in both HL-60 and NB4 cell lines and may reduce the expression of 14-3-3 ϵ in NB4 cells.²⁷ It is known that the 14-3-3 family of proteins has a very broad range of specificities, including the activation of some PKC isoform leading to activation of caspase networks.^{32,33} In addition, it was reported that stable expression of 14-3-3 ϵ in colorectal cancer cells protected cells from apoptosis.³⁴ Our data demonstrate that, in both HL-60 and NB4 cells, a reduced amount of Vav1 during ATRA treatment is accompanied by an increased expression of 14-3-3 ϵ . This suggests that the amount of Vav1 may be critical in modulating the mechanism of caspase activation in acute promyelocytic leukemia.

Concerning the activity α -enolase, multifunction protein involved in glycolysis, it has been detected in the sera of a number of cancer patients and seems to have a role in tumorigenesis.³⁵ α -enolase was found to be expressed at high levels in most AML subtypes in which it might contribute to the adverse evolution of the disease.³⁶ In acute promyelocytic leukemia, α -enolase shows a relatively low up-regulation in comparison to the other AML,³⁶ and proteomic analysis of APL-derived cell lines demonstrated that it is one of the protein whose expression increases after ATRA treatment.²⁹ This indicates that α -enolase, involved in carbohydrate metabolism, may provide energy for synthesis of proteins supporting the differentiation process. Reduced α -enolase expression as a consequence of a down-modulated amount of Vav1 during ATRA-induced differentiation of APL-derived cells suggests that Vav1 may sustain the agonist dependent completion of the maturation program of tumoral promyelocytes also targeting metabolic pathways.

As a consequence of a reduced amount of Vav1 during ATRA treatment of both HL-60 and NB4 cells, the proteasome component splice isoform 2 subunit α 3 is also down-modulated. Since proteasome is the major cellular proteolytic machinery responsible for degradation of both normal and damaged proteins,³⁷ our data suggest that Vav1, during ATRA dependent maturation of tumoral promyelocytes, may also be involved in regulating protein degradation.

Concerning α -tubulin, it is a component of microtubules, which deliver positional signals and are required for establish-

research articles

ing polarity in many different organisms and cell types. It is known that ATRA induces, in both HL-60 and NB4 cells, development of chemoattractant-directed migration and eventual apoptosis, but no data support the involvement of microtubules and, thus, of α -tubulin, in this phenomena.^{38,39} Other cytoskeleton-related events may then require the increase of α -tubulin induced by ATRA during the differentiation process of myeloid precursors. At any rate, it is difficult to explain the further increase of protein expression observed when differentiation treatment was performed in the presence of reduced amount of Vav1.

Experiments performed with the early promyelocytes HL-60 treated with ATRA indicated that the tyrosine phosphorylation of Vav1 seems to regulate nuclear morphology of differentiating cells.¹⁶ Here we show that, also in the late promyelocytes NB4, tyrosine-phosphorylated Vav1 seems to be responsible of the modifications of the nuclear morphology that occur during the completion of the maturation program along the granulocytic lineage, without significantly affecting the expression of specific differentiation markers. Accordingly, proteomic analysis indicates that, in both HL-60 and NB4 cells, only a skeleton-related protein, α -tubulin, appears significantly modulated when the Syk-dependent tyrosine phosphorylation of Vav1 was specifically inhibited by Piceatannol during ATRA treatment.

Unexpectedly, we have found that α -tubulin was down-modulated when Vav1 tyrosine phosphorylation was inhibited and up-regulated when the whole Vav1 protein was reduced during ATRA treatment. This suggests that different pools of Vav1 may play diverse roles on the synthesis and degradation of this microtubule component. At any rate, since we have only evaluated the tyrosine phosphorylation of Vav1 dependent from the tyrosine kinase Syk, it is not excluded that different tyrosine residues phosphorylated by diverse kinases may be involved in the Vav1-dependent modulation of protein expression.

The results presented in this paper show a first evidence of a role for Vav1 in regulating protein expression. Even though the comprehension of the exact mechanism needs more investigations, our data may lead to progress in understanding the mechanism by means of which ATRA performs its maturation program and identify Vav1 as a potential target for new strategies in therapy of acute promyelocytic leukemia.

Abbreviations: APL, acute promyelocytic leukemia; ATRA, all *trans*-retinoic acid; GEF, guanine nucleotide exchange factor; DAPI, 4'-6-diamidino-2-phenylindole; PE, phycoerythrin; siRNA, small interfering RNA.

Acknowledgment. This research was supported by grants from MIUR Cofin (2005), Interdisciplinary Center for the Study of Inflammation (ICSI) and local funds from University of Ferrara (Italy) to S. Capitani and V. Bertagnolo.

References

- (1) Nagler, A.; Riklis, I.; Kletter, Y.; Tatarsky, I.; Fabian, I. *Exp. Hematol.* **1986**, *14*, 60–65.

- (2) De Luca, L. M. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2924–2933.
- (3) Collins, S. J. *Leukemia* **2002**, *16*, 1896–1905.
- (4) Castaigne, S.; Chomienne, C.; Daniel, M. T. *Blood* **1990**, *76*, 1704–1709.
- (5) Tallman, M. S. *Leukemia* **1998**, *12*, S37–S40.
- (6) Aribi, A.; Kantarjian, H. M.; Estey, E. H.; Koller, C. A.; et al. *Cancer* **2007**, *109*, 1355–1359.
- (7) Breitman, T. R.; Selonick, S. E.; Collins, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 2936–2940.
- (8) Lanotte, M.; Martin-Thouvenin, V.; Najman, S.; Balerini, P.; et al. *Blood* **1991**, *77*, 1080–1086.
- (9) Barber, N.; Belov, L.; Christopherson, R. I. *Leuk. Res.* **2008**, *32*, 315–322.
- (10) Wulf, G. M.; Adra, C. N.; Lim, B. *EMBO J.* **1993**, *12*, 5065–5074.
- (11) Zhang, R.; Tsai, F. Y.; Orkin, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 12755–12759.
- (12) Bustelo, X. R. *Front. Biosci.* **2002**, *7*, d24–d30.
- (13) Tybulewicz, V. L. *Curr. Opin. Immunol.* **2005**, *17*, 267–274.
- (14) Bertagnolo, V.; Brugnoli, F.; Mischiati, C.; Sereni, A.; et al. *Exp. Cell Res.* **2005**, *306*, 56–63.
- (15) Katzav, S. *Cancer Lett.* **2007**, *255*, 241–254.
- (16) Bertagnolo, V.; Marchisio, M.; Brugnoli, F.; Bavelloni, A.; et al. *Cell Growth Differ.* **2001**, *12*, 193–200.
- (17) Bertagnolo, V.; Brugnoli, F.; Marchisio, M.; Celeghini, C.; et al. *Cell. Signalling* **2004**, *16*, 423–433.
- (18) Bertagnolo, V.; Marchisio, M.; Volinia, S.; Caramelli, E.; Capitani, S. *FEBS Lett.* **1998**, *441*, 480–484.
- (19) Houliard, M.; Arudchandran, R.; Regnier-Ricard, F.; Germani, A.; et al. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 1115–1127.
- (20) Katzav, S. *Blood* **2004**, *103*, 2443–2451.
- (21) Bavelloni, A.; Faenza, I.; Cioffi, G.; Piazzì, M.; et al. *Proteomics* **2006**, *6*, 5725–5734.
- (22) Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; et al. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1327–1333.
- (23) Bottino, C.; Castriconi, R.; Pende, D.; Rivera, P.; et al. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 557–567.
- (24) Musante, L.; Bruschi, M.; Candiano, G.; Petretto, A.; et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *349*, 668–673.
- (25) Kersey, P. J.; Duarte, J.; Williams, A.; Karavidopoulou, Y.; et al. *Proteomics* **2004**, *4*, 1985–1988.
- (26) Adamski, M.; Blackwell, T.; Menon, R.; Martens, L.; et al. *Proteomics* **2005**, *5*, 3246–3261.
- (27) Harris, M. N.; Ozpolat, B.; Abdi, F.; Gu, S.; et al. *Blood* **2004**, *104*, 1314–1323.
- (28) Wan, J.; Wang, J.; Cheng, H.; Yu, Y.; et al. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3026–3037.
- (29) Wang, D.; Jensen, R.; Gendeh, G.; Williams, K.; et al. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 627–635.
- (30) Dong, H.; Ying, T.; Li, T.; Cao, T.; et al. *J. Cell Biochem.* **2006**, *98*, 1495–1506.
- (31) Romero, F.; Dargemont, C.; Pozo, F.; Reeves, W. H.; et al. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 37–44.
- (32) Van Der Hoeven, P. C.; Van Der Wal, J. C.; Ruurs, P.; Van Blitterswijk, W. J. *Biochem. J.* **2000**, *347*, 781–785.
- (33) Tzivion, G.; Gupta, V. S.; Kaplun, L.; Balan, V. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 203–213.
- (34) Liou, J. Y.; Ghelani, D.; Yeh, S.; Wu, K. K. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 3185–3191.
- (35) Zou, L.; Wu, Y.; Pei, L.; Zhong, D.; et al. *Leuk. Res.* **2005**, *29*, 1387–1391.
- (36) López-Pedrerá, C.; Villalba, J. M.; Siendones, E.; Barbarroja, N.; et al. *Proteomics* **2006**, *6*, S293–S299.
- (37) Von Mikecz, A. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 1977–1984.
- (38) Olins, A. L.; Herrmann, H.; Lichten, P.; Olins, D. E. *Exp. Cell Res.* **2000**, *254*, 130–142.
- (39) Veselská, R.; Zitterbart, K.; Jelínková, S.; Neradil, J.; Svoboda, A. *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1049–1058.

PR7008719