UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

DOTTORATO DI RICERCA
IN GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE

XVIII CICLO

TESI SPERIMENTALE:

Lipossigenasi e sopravvivenza cellulare in linee tumorali di linfoma Burkitt convertite con il Virus di Epstein-Barr

BIO 18

Dottoranda
Maria Cristina Belfiore

DABAC
Dipartimento di AgroBiologia e AgroChimica
Via S.Camillo de Lellis s.n.c.
Viterbo

Docente guida
Prof. Giampiero Gualandi

Coordinatore del Dottorato
Prof. Luigi Bosco

INDICE

RIASSUNTO……pag. i

INTRODUZIONE……..pag.1

I LINFOMI……» 1

1. LA CLASSIFICAZIONE DEI LINFOMI……... » 3

2. LA PATOGENESI DEI LINFOMI B……...» 5

2.1 Alterazioni Citogenetiche……..…….....» 5
2.2 BCR e Microambiente Cellulare nella Linfomagenesi…….....» 8
2.3 Il Virus Di Epstein Barr
e l'insorgenza dei Linfomi ad esso associati…….....» 10

3. LINFOMI E RESISTENZA AI TRATTAMENTI CHEMIOTERAPICI…….……..» 18

3.1 Alterazioni nelle Vie di Trasduzione del Segnale…….. »20
3.1.1 Vie delle MAPK…….….»20
3.1.2 Via della PI3K/Akt.....»25
3.1.3 NF-kB…….…….....»28
3.2 Alterazioni nelle Vie Apoptotiche……..……»32
3.2.1 Bcl-2…….……...»34
3.2.2 IAPs…….……...….»38

STRESS OSSIDATIVO……..……»44

4. SISTEMI ENZIMATICI CHE GENERANO RADICALI LIBERI…….…….»45

4.1 Trasduzione del Segnale
e Regolazione dell'Espressione Genica Ros mediata……..»46
4.2 Ros e Cancro……...……...……»48

LE LIPOSSIGENASI……..……»50

5. 5-LIPOSSIGENASI E LINFOCITI B…….……...»53

5.1 Lipossigenasi e Carcinogenesi……...…….……...….pag. 57
5.2 Trasduzione del Segnale mediante Hete……..……...….»60

5.3 Gli Inibitori delle Lox……..……..…….pag. 64

PRESENTAZIONE E SCOPO DEL LAVORO……..….pag. 68

MATERIALI E METODI……...……..pag. 70

- **Composti Chimici……...……...……» 70**
- **Linee Cellulari……..…….…… » 74**
- **Colture Cellulari……..……..……...…» 75**
- **Analisi Morfologica…….....……...……...» 75**
- **RT-PCR e PCR Real Time……...……..……» 76**
- **Western Blotting……...…….……» 81**
- **Analisi Citofluorimetrica……...……..…» 86**
- **Studio dell'Attivita' Lipossigenasica: Analisi della Produzione di Hete mediante HPLC……» 89**

RISULTATI……..…….pag. 92

- **Linee di Linfoma di Burkitt EBV+ mostrano una aumentata resistenza all'apoptosi: Sovra-Espressione di Bcl-2 in assenza di LMP1……..……...» 92**
- **L'infezione con EBV corrisponde ad un aumento nel livello di perossidi spontanei direttamente correlato alla resistenza…....» 95**
- **Un'attivita' enzimatica Lipossigenasica contribuisce a mantenere elevati i livelli di perossidi nelle linee EBV+…….....…….....» 97**
- **Attivita' Citotossica degli Inibitori delle Lox…….……..…..……..» 98**
- **Studio di Espressione delle diverse Isoforme Lipossigenasiche……..…….……..» 99**
- **Correlazione tra Espressione della 5-Lox e livelli di perossidi…….……..….» 104**
- **Effetti protettivi degli Hete sull'apoptosi indotta da Inibizione delle Lox…….……...…»105**
- **Studio della Trasduzione del Segnale mediato dagli Hete: PPARS, MAPK PI3K/AKT……..…» 107**
- **Studio delle Vie Apoptotiche innescate da inibizione della 5-Lox...…….……...…Pag. 114**
- **Attivita' Citotossica in BL41 vs E2R di Lignani di Neo-Sintesi…….……...……»123**

DISCUSSIONE.....pag. 127

RINGRAZIAMENTI.....»142

PUBBLICAZIONI
E COMUNICAZIONI A CONGRESSI.....»143

BIBLIOGRAFIA.....pag. 144

RIASSUNTO

Molte forme aggressive di linfomi B sono ancora scarsamente curabili e tra questi il linfoma di Burkitt, la cui insorgenza è fortemente associata all'infezione con il virus di Epstein Barr.

Alla base dell'assenza di una risposta ad un convenzionale trattamento chemioterapico vi sono alterazioni molecolari e genetiche che comportano resistenza all'apoptosi.

Nel nostro sistema cellulare di linfoma di Burkitt dopo infezione con il virus di Epstein Barr e l'instaurarsi della latenza sono stati ottenuti dei cloni EBV positivi (HS1, E2b ed E2R) caratterizzati da una maggiore resistenza a vari trattamenti apoptogeni e da una sovra-espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2, in assenza della proteina latente di membrana LMP1.

I cloni EBV positivi presentano più alti livelli di perossidi endocellulari ed in maniera direttamente correlata alla resistenza all'apoptosi.

La ricerca che è stata condotta durante questi anni ha portato ad individuare l'attività enzimatica della 5-lipossigenasi come principale fonte che contribuisce al più alto stato ossidativo nei cloni EBV positivi: inibitori delle lipossigenasi ed in particolare della isoforma 5-LOX riducono infatti sensibilmente i livelli ossidativi e soprattutto nella linea EBV positiva E2R.

Da studi di espressione mediante RT-PCR è stato visto che la isoforma 5-lipossigenasi è maggiormente espressa nel clone EBV positivo E2R, seguita dalla isoforma 12-lipossigenasi mentre solo debolmente espressa risulta la isoforma 15-LOX2; la isoforma 15-LOX1 e le ciclossigenasi non sono invece affatto espresse.

E’stata altresì trovata mediate PCR quantitativa in Real-Time una chiara e diretta relazione tra l’espressione della isoforma 5-LOX ed i livelli di perossidi nei diversi cloni.

Gli inibitori specifici della isoforma 5-LOX (AA861, MK886, BWA4C) inducono fortemente in apoptosi la linea cellulare E2R; ciò indica che la 5-lipossigenasi interviene nel mediare segnali di sopravvivenza; è stato dimostrato che questa segnalazione procede tramite particolari metaboliti delle LOX, gli acidi idrossieicosatetraenoici (HETE) che proteggono le cellule della linea E2R dall’apoptosi indotta da inibizione lipossigenasica.

Inoltre sono state studiate le vie apoptotiche attraverso le quali si attua il processo di morte dopo inibizione della 5-LOX.

Si è potuto dimostrare che a fronte di un’attivazione costitutiva delle caspasi nei controlli l’apoptosi non procede poiché vi è un blocco sulle caspasi attive stesse operato dalla proteina antiapoptotica XIAP.

L’apoptosi nella linea cellulare E2R è accompagnata sempre da un rilascio mitocondriale molto precoce della proteina pro-apoptotica Smac, precedente al rilascio di citocromo c, e da una diminuzione di XIAP; infine solo l’inibizione della caspasi 3, e non l’inibizione delle caspasi 9 e 8, protegge le nostre cellule E2R dalla morte a dimostrazione del fatto che il processo è caspasi 3-dipendente quando il rilascio mitocondriale di Smac causa l’eliminazione del blocco operato da XIAP.

Alla luce di questi risultati è possibile ipotizzare dei nuovi protocolli chemioterapici che facciano uso sia di inibitori delle lipossigenasi, sia di farmaci con un’azione simile a Smac, in combinazione con altri trattamenti per sensibilizzare i linfomi all’apoptosi.

Infine il nostro sistema cellulare BL41 vs E2R è stato utilizzato per saggiare l'azione apoptogenica ed antiossidante di lignani ariltetralinici con una potenziale azione di inibitori della 5-LOX; interessante è stato notare che alcuni derivati di neosintesi sono fortemente citotossici sulla linea cellulare resistente E2R.

INTRODUZIONE

I LINFOMI

I linfomi sono tumori maligni derivanti dalla trasformazione neoplastica delle cellule linfoidi. Tradizionalmente il termine linfoma indica quelle neoplasie linfoidi che si presentano clinicamente in forma di masse tissutali, contrariamente alle leucemie nelle quali prevale l'interessamento midollare ed ematico.

I linfomi sono patologie eterogenee sia sul versante clinico che su quello istologico e molecolare e sono suddivisi in due grandi categorie: i linfomi propriamente detti o linfomi non Hodgkin (LNH) e il linfoma di Hodgkin (LH). Studi recenti sembrano tuttavia indicare una derivazione linfocitaria (prevalentemente B) anche per la cellula di Reed-Sternberg, elemento morfologico identificativo del LH (Hennessy , 2004).

I LNH rappresentano il 70% di tutti i linfomi e sono suddivisi in base alla loro derivazione B o T cellulare.

I LNH costituiscono il 5% di tutte le neoplasie maligne, si collocano al quinto posto tra le cause di morte per tumore, con un picco di incidenza tra i 45 e i 60 anni (anche se si può essere colpiti a qualsiasi età) (Fisher and Fisher, 2004).

Sebbene sia stata segnalata una possibile maggiore incidenza di linfoma nei maschi, il divario tra i due sessi si sta progressivamente riducendo. L'incidenza dei linfomi NH è in aumento, specialmente nei paesi sviluppati, e per le forme più aggressive è addirittura triplicata. Dai dati raccolti nei registri tumori in Italia si stima per i LNH un incidenza di 15,9 casi su 100.000 abitanti/anno nei maschi e 10,9 nelle femmine.

Sulla base dei dati dell'International Lymphoma Study Group, il 30,6% dei LNH è rappresentato dal LNH diffuso a grandi cellule (DLBCL); seguono in ordine di frequenza il LNH follicolare (22,1%), il LNH della zona marginale (7,6%), il LNH a

cellule T periferiche, (7%), la forma a piccoli linfociti o leucemia linfatica cronica(LLC) (6,7%), il LNH mantellare (6%), il LNH a grandi cellule B primitivo del mediastino (2,4%), il LNH anaplastico a cellule T (2,4%), il LNH a cellule B Burkitt-like (una delle due forme di linfoma di Burkitt) (2,1%) e con frequenze minori le altre forme.

Fattori di rischio per l'insorgenza di un linfoma sono rappresentati da varie situazioni patologiche o da immunodepressione severa o moderata. Si possono considerare per esempio l'immunosoppressione terapeutica che fa seguito ad un trapianto, le malattie autoimmuni (morbo celiaco, dermatite erpetiforme, lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide), alcune immunodeficienze congenite (atassia telangectasia, immunodeficienza congenita legata al cromosoma X, immunodeficienza severa combinata).

Ci sono poi numerosi agenti infettivi implicati nella genesi dei linfomi, primo fra tutti il virus di Epstein-Barr (EBV) ubiquitario ed estremamente diffuso (Thorley-Lawson, 2004).

Segue il virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV) e tra i LNH correlati all'HIV predominano le forme B ad alto grado di malignità, specialmente il LNH immunoblastico e il Burkitt. Anche il virus dell'epatite C e l'*Helicobacter pilori* sono implicati nell'insorgenza dei LNH; quest'ultimo in particolare nell'insorgenza del linfoma a primitività gastrica (tessuto linfoide associato alla mucosa o MALT).

Nell'insorgenza dei LNH sono pure coinvolti agenti fisici (radiazioni ultraviolette legate all'esposizione solare) e chimici (pesticidi, erbicidi, insetticidi). Agenti fisici, chimici ed infettivi, consentirebbero all'EBV e ad atri virus non noti di indurre la proliferazione neoplastica delle cellule B (Trimestrale di aggiornamento-Ricerca Roche. I linfomi non Hodgkin. Dicembre 2003).

1. La classificazione dei linfomi

La classificazione dei linfomi e stata sempre molto controversa.

Mentre alcune tra le prime classificazioni erano basate solo sulle caratteristiche citomorfologiche e immunologiche dei linfomi (la classificazione di Kiel), altri sistemi si basavano sulla risposta al trattamento e sulla sopravvivenza (Working Formulation).

Tabella 1: classificazione dei linfomi B secondo la World Health Organization Lymphoma classification del 2001.

Neoplasie a cellule B
1. **Leucemia o linfoma linfoblastico dei progenitori B**
2. **Neoplasie a cellule B periferiche** Linfoma B linfocitico o leucemia linfatica cronica Leucemia prolinfocitica B Linfoma linfoplasmocitico Linfoma mantellare Linfoma follicolare Linfoma dei centri follicolari primitivo cutaneo Linfoma B della zona marginale del tessuto linfoide associato alla mucosa (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT-type) Linfoma B della zona marginale nodale(± cellule B monocitoidi) Linfoma B della zona marginale splenica (± linfociti villosi) Leucemia a cellule capellute (hairy cell leucemia) Linfoma B diffuso a grandi cellule Varietà Centroblastico Immunoblastico Ricco in linfociti T e istiociti A grandi cellule B anaplastiche Sottotipi linfoma B mediastinico (timico) a grandi cellule Linfoma B intravascolare a grandi cellule Linfoma B primitivo delle cavità sierose Linfoma di Burkitt Plasmocitoma o mieloma multiplo
3. **Linfoma di Hodgkin** Linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria Linfoma di Hodgkin classico Linfoma di Hodgkin, sclerosi nodulare Linfoma di Hodgkin classico, ricco in linfociti Linfoma di Hodgkin, cellularità mista Linfoma di Hodgkin, deplezione linfocitaria

Nel 1994 un gruppo di emolinfopatologi ha tentato di unificare le esperienze e i diversi approcci metodologici delle scuole europea e statunitense dando vita alla Revised European American Lymphoma (REAL) Classification (Harris, 2000). Nel 1995 la Word Health Organization (WHO) si è posta l'obiettivo di dedicare un nuovo 'blue book' esclusivamente alle patologie del sistema emolinfopoietico. Questo progetto si è concretizzato nel 2001 con l'edizione della versione definitiva della 'WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues' (Ottensmeier 2001) (Tabella1).

Ciascuna entità compresa nella classificazione WHO viene identificata mediante la combinazione di dati non solo morfologici ma anche clinici e biologico-funzionali come il profilo immunofenotipico (Maryalice Stetler-Stevenson, 2003) e le caratteristiche molecolari e citogenetiche.

I linfomi vengono suddivisi distinguendo le forme che derivano dai progenitori e le forme che originano dalle cellule periferiche, con caratteristiche corrispondenti alle fasi più precoci e a quelle più avanzate dei processi maturativi-differenziativi delle cellule B. Da questo punto di vista i linfomi B umani sono classificati facendo riferimento a una controparte cellulare normale corrispondente ad un precursore cellulare B che appare come 'congelato' in un particolare stadio del differenziamento a seconda delle caratteristiche patogenetiche del tumore. Per esempio alcuni linfomi derivano da cellule che si trovano nei centri germinativi linfonodali, altri da plasmacellule. Un gruppo a parte e rappresentato dai LH.

Nell'ambito dei LNH periferici sono state identificate varie entità raggruppate sulla base delle principali modalità di presentazione clinica (forme disseminate/leucemiche, primitivamente nodali vs prevalentemente extranodali).

La classificazione WHO è stata sottoposta a una validazione clinica sia attraverso lo studio dell'International Lymphoma Study Group, sia attraverso una serie di successivi e più recenti 'trial' clinici. Studi di correlazione hanno permesso, sul versante clinico, una stratificazione dei vari sottotipi di LNH in forme indolenti e in forme aggressive. Le forme indolenti comprendono tutti i LNH (nodali ed extranodali) con una sopravvivenza dell'ordine di alcuni anni, indipendentemente da un eventuale trattamento terapeutico. Le forme aggressive includono invece tutti i LNH a decorso rapidamente fatale (da poche settimane a mesi) in assenza di terapia (Tabella 2) (Trimestrale di aggiornamento-Ricerca Roche. I linfomi non Hodgkin. Dicembre 2003).

2 La patogenesi dei linfomi B

2.1. Alterazioni citogenetiche

Nella patogenesi dei linfomi alterazioni citogenetiche determinano l'instaurarsi del fenotipo maligno e si identificano in peculiari eventi trasformanti.

Nelle neoplasie delle cellule B immature si osservano singole traslocazioni che possono non essere associate con i loci immunoglobulinici, mentre nei tumori delle cellule B mature si verificano eventi citogenetici molto più complessi comprendenti traslocazioni reciproche tra loci immunoglobulinici e protoncogeni insieme a mutazioni, delezioni e amplificazioni.

A seguito di una traslocazione reciproca l'oncogene viene a cadere sotto il controllo di loci Ig attivi e ciò ne causa l'espressione costitutiva deregolata (Willis and Dyer, 2000).

Il coinvolgimento dei loci Ig non è casuale ma è fortemente dipendente da tutti quei processi di rimodellamento genico che hanno luogo nelle porzioni cromosomiche

deputate a codificare le regioni variabili e costanti delle Ig: la ricombinazione V(D)J e l'ipermutazione somatica selezionano positivamente i cloni cellulari B con il più elevato grado di specificità e affinità nel riconoscimento antigenico; la ricombinazione che comporta il cosiddetto 'switching' di classe determina la produzione di immunoglobuline con diverse funzioni effettrici.

Tabella 2: Suddivisione clinica dei linfomi B non Hodgkin in forme indolenti e forme aggressive

Neoplasie a cellule B	
1. **Linfomi indolenti**	**Frequenza**
Linfoma follicolare	22,1%
Plasmocitoma o mieloma	15,0 %
Linfoma B della zona marginale del tessuto associato alle mucose	7,6 %
Linfoma B linfocitico o leucemia linfatica cronica	6,7 %
Linfoma a cellule capellute	2%
Linfoma B della zona marginale nodale	1,8%
Linfoma linfoplasmacitico	1,2%
Linfoma B della zona marginale splenica	≤1,0 %
2. Linfomi aggressivi	
Linfomi B diffusi a grandi cellule	30,6%
Linfoma mantellare	6%
Linfoma di Burkitt	2,5%
Leucemia o linfoma linfoblastico dei progenitori B	Rara
Linfoma follicolare (gradoIII)	

Esempi di traslocazioni cromosomiche derivanti dalla ricombinazione V(D)J sono la traslocazione t(11;14) bcl1/IgH del linfoma mantellare e la traslocazione t(14;18) bcl2/IgH del linfoma follicolare. Sembra, infatti, che la ricombinazione V(D)J si verifichi non solo nelle prime fasi di sviluppo dei precursori B nel midollo osseo ma anche nelle cellule B ai centri germinativi (GC). I modelli proposti per spiegare gli eventi di traslocazione prevedono la formazione di tagli a doppio filamento sul DNA e la partecipazione degli enzimi RAG 1 e 2 (recombination activating gene) che oltre ad

avere attività endonucleasica sono dotati di un'attività trasposasica (Kuppers and Dalla-Favera, 2001). A seguito di errori nella ricombinazione V(D)J possono verificarsi anche trasposizioni di oncogeni nei loci Ig o eventi di delezione nei loci non-Ig coinvolgenti oncogeni o geni soppressori di tumori.

Traslocazioni cromosomiche con siti di rottura collocati nelle regioni di switch isotipico coinvolgono c-myc nel linfoma di Burkitt sporadico (c-myc/Ig, t(8;14)) o il gene bcl6 nel linfoma diffuso a grandi cellule (DLBCL) (bcl6/IgH t(3;14)); lo stesso switching di classe può dare origine a inserzioni di frammenti escissi in altri loci.

L'ipermutazione somatica genera sostituzioni nucleotidiche ma anche delezioni e duplicazioni, ed è coinvolta direttamente nel causare traslocazioni cromosomiche per esempio nel Burkitt e nel DLBCL ma anche nei mielomi, in quanto genera tagli a doppio filamento nei segmenti genici delle regioni V immunoglobuliniche che hanno già riarrangiato e che risultano altamente ricombinogeni. Questo processo è RAG indipendente. Interessante è inoltre sottolineare che l'ipermutazione somatica può partecipare alla linfomagenesi come un processo che agisce non solo sui loci IgV già riarrangiati ma su vari geni cellulari, sia su regioni codificanti ma anche su sequenze regolatorie; per esempio studi hanno rivelato che il gene bcl-6 o il gene per Fas (CD95) possono essere mutati nelle cellule B normali ai centri germinativi all'interno di un fenomeno fisiologico. Mutazioni inattivanti del gene per CD95 sono state trovate in circa il 20% dei linfomi dei centri germinativi.

Esistono ancora innumerevoli alterazioni genetiche che caratterizzano i linfomi: mutazioni o delezioni possono riguardare geni soppressori di tumori come IkBα o p53; possono osservarsi amplificazioni come quelle dei geni c-rel; alterazioni di geni che

controllano l'integrità genomica come ATM (Siebert et al. 2001; Staudt and Wilson, 2002).

Considerato che traslocazioni cromosomiche sono state osservate anche in cellule B di donatori sani si deve considerare la linfomagenesi come un processo multistadio in cui un singolo evento trasformante non è sufficiente a determinare l'instaurarsi del fenotipo maligno.

2.2 BCR e microambiente cellulare nella linfomagenesi

Negli ultimi anni sta emergendo sempre di più un nuovo modo di considerare la patogenesi dei linfomi in cui la progressione tumorale è dipendente non solo da anormalità citogenetiche ma da particolari segnali di sopravvivenza cellulare mediati o tramite l'espressione del recettore delle cellule B (BCR), o tramite stimolazione antigenica, o ancora attraverso particolari interazioni cellulari che si stabiliscono nel microambiente tumorale (Kuppers, 2005).

E' interessante notare che le traslocazioni osservate nei loci-Ig sono sempre a carico del locus allelico immunoglobulinico in cui si sono avuti riarrangiamenti non produttivi; quindi gli alleli Ig espressi non possono essere inattivati da traslocazioni, poiché l'inabilità a formare correttamente un BCR è in molti casi incompatibile con la sopravvivenza.

Il linfoma di Burkitt, il linfoma mantellare, la leucemia a cellule capellute, DLBCL sono tutti casi di tumori che dipendono dall'espressione del BCR.

Tuttavia in alcuni casi eccezionali, come nel linfoma di Hodgkin classico, si osservano delle mutazioni nei geni codificanti le regioni IgV che fanno sì che le cellule di Hodgkin

e Reed-Sternberg (HRS), derivanti da cellule B pre-apoptotiche ai centri germinativi, perdano la capacità di esprimere un BCR con alta affinità. E'stato suggerito che queste cellule HRS possono sfuggire alla selezione negativa ai centri germinativi poichè infettate da EBV (circa il 50% dei LH sono EBV positivi) e in particolare grazie all'espressione della proteina virale LMP2A. LMP2A possiede dei motivi ITAM simili a quelli trovati nelle nelle Igα e Igβ del BCR che possono supplire alla mancanza di un recettore pienamente funzionante attivando le stesse vie di sopravvivenza e proliferazione cellulare (Merchant et al., 2000).

Le cellule di un linfoma che esprimono un BCR funzionale riconoscono antigeni e tale stimolazione contribuisce alla proliferazione del linfoma. Si può trattare di autoantigeni, come nel caso della B-CLL, di superantigeni, come nel caso del linfoma primario del sistema nervoso centrale o di antigeni provenienti da infezione esterna come quella da *Helicobacter pilori* nel linfoma MALT.

L'importanza del microambiente in cui si sviluppa il linfoma nel contribuire alla crescita tumorale è stata dimostrata, tra gli altri, da studi relativi al linfoma follicolare. Se le cellule di questo tumore, che risiedono e proliferano nei follicoli linfoidi in stretta associazione con cellule T helper e cellule follicolari dendridiche, sono poste *in vitro* sopravvivono solo se viene almeno in parte ricreato quell'ambiente, e cioè in presenza di linfociti T CD4+, di cellule stromali e di anticorpi contro il CD40.

Analisi istologiche hanno dimostrato l'importanza del microambiente anche nel linfoma di Hodgkin dove le cellule HRS sono solo l'1% delle cellule del tessuto tumorale, mentre gran parte dell'infiltrato cellulare è composto da cellule T, eosinofili, macrofagi, plasmacellule. E' chiaro che in condizioni ambientali così complesse le varie componenti cellulari comunicano tra di loro tramite citochine, fattori di crescita,

mediatori infiammatori come prostaglandine e leucotrieni, attraverso meccanismi autocrini e paracrini piuttosto evoluti (Thomas et al., 2004).

2.3 Il virus di Epstein-Barr e l'insorgenza dei linfomi ad esso associati

Il virus di Epstein Barr, della famiglia degli herpes virus, è pressoché ubiquitario infettando il 95% della popolazione adulta; può causare mononucleosi infettiva oppure l'infezione può risultare asintomatica; in ogni caso il virus è in grado di persistere latentemente nelle cellule B della memoria.

Si può dimostrare un'evoluzione di tale virus in stretta associazione con la specie umana e in particolare con i linfociti B: EBV è in grado di sfruttare opportunisticamente tutti i vari stadi dello sviluppo e del differenziamento del ciclo vitale di un linfocita B per instaurare e mantenere persistentemente un'infezione.

La cellula B 'naive' infettata viene attivata a diventare un blasto proliferante dall'espressione del cosiddetto programma di crescita: in queste condizioni sono espresse tutte le proteine virali da EBNA-1 a EBNA-6, LMP-1, LMP2A ed LMP2B. Questo stadio di attivazione è necessario perché il virus possa raggiungere la condizione di latenza nelle cellule della memoria passando attraverso i centri germinativi, ma tale programma di espressione è fortemente immunogenico.

La strategia virale prevede quindi il passaggio dal programma di crescita al cosiddetto programma 'default' in cui sono espressi solo EBNA-1, LMP-1 ed LMP-2A e le cellule della memoria che così prendono origine, dai centri germinativi vanno in circolo e permettono la persistenza del virus nell'ospite per tutta la durata della sua vita grazie al programma di latenza che non prevede l'espressione di nessun gene virale.

Solo quando la cellula B della memoria si divide viene espresso EBNA-1 per permettere la replicazione del DNA virale. Il ciclo vitale di EBV si chiude sfruttando l'ultimo stadio del differenziamento cellulare B, considerando che la sua riattivazione e replicazione, attraverso l'espressione dei geni del ciclo litico, per la diffusione ad altri individui, si verifica quando le cellule della memoria infettate latentemente si differenziano in plasmacellule.

Comprendere la stretta relazione tra il ciclo di EBV e ciclo biologico di un linfocita B può aiutare a spiegare il contributo virale nella patogenesi di un linfoma: EBV infatti è presente nel 98% dei casi di linfoma di Burkitt nelle regioni dell'Africa equatoriale dove è endemico (Van den Bosch, 2004), ed è anche presente nel 20% dei casi di linfoma di Burkitt nelle altre aree geografiche. Anche il 40-50% dei tumori di Hodgkin sono EBV positivi.

Esistono dei checkpoint putativi nel ciclo vitale di EBV che possono dare origine a un linfoma. E' stato supposto che il linfoma di Burkitt potrebbe derivare da cellule EBV positive ai centri germinativi che stanno entrando nel compartimento di cellule della memoria; se si verifica la traslocazione di c-myc tale cellula potrebbe essere stimolata a proliferare esprimendo solo EBNA-1. Il linfoma di Hodgkin potrebbe invece derivare da cellule infettate ai centri germinativi che acquisiscono una mutazione durante la mononucleosi infettiva che blocca il loro differenziamento e che esprimono il programma 'default' (Thorley-Lawson and Gross, 2004).

Le cellule B che ospitano EBV sono un facile bersaglio di eventi trasformanti: la persistenza del genoma virale produce stress ossidativo e instabilità cromosomica; proteine virali interferiscono con varie vie di segnalazione intracellulare con

conseguente perdita del controllo del ciclo cellulare e aumentata resistenza all'apoptosi (Spender et al., 1999).

EBV può causare instabilità genomica con vari meccanismi. Prima di tutto è stato visto in varie linee cellulari che il genoma virale, oltre ad essere mantenuto in forma episomica, può integrarsi come via alternativa dell'infezione persistente. L'integrazione di EBV è stata dimostrata in linee cellulari linfoblastoidi come le RGN1 (Gualandi et al.,1995) o in linee derivanti da espianti di linfoma di Burkitt come le Namalwa (Gargano et al.,1992) o le Raji (Takakuwa et al., 2004). Nella linea cellulare derivante da un linfoma di Burkitt americano NAB-2, EBV risulta integrato tra due oncogeni, REL e BCL11A, e ciò viene a comportare l'aumento di espressione degli stessi geni REL (Luo et al., 2004); quindi l'integrazione può essere un importante meccanismo per l'interazione di EBV con geni cellulari in particolare con quelli coinvolti nella regolazione della crescita, nella proliferazione e sopravvivenza cellulare e nella tumorigenesi; e tale evento è probabilmente molto più diffuso di quanto si creda, anche nei linfomi che ad una tardiva analisi risultano EBV negativi. E' stato supposto che in questi casi EBV agisce nella linfomagenesi con un meccanismo 'hit-and-run' (Ambinder R., 2000) poiché integrandosi viene a produrre delle regioni cromosomiche particolarmente suscettibili ad eventi di rottura, i così detti siti fragili, con conseguenti perdite di DNA virale e cromosomale (Jox et al., 1997). A tal proposito è stato dimostrato che molti casi di linfoma di Hodgkin EBV negativi perché non esprimenti i piccoli RNA virali detti EBERs, in realtà presentano tracce della antica infezione virale e cioè DNA virale difettivo chiamato eterogeneo (het) (Gan Yan-Jun et al., 2002). Alcuni casi di linfoma di Hodgkin EBV positivi, in ricaduta si negativizzano perdendo il genoma virale (Nerurkar et al., 2000). Sembra che lo stesso DNA eterogeneo possa

contribuire alla perdita del DNA virale presente in forma episomica (Srinivas et al., 1998).

EBV possiede un secondo potenziale meccanismo in grado di causare instabilità genomica e cioè l'induzione dell'espressione dei geni per gli enzimi RAG1 e RAG2 che attivano la ricombinazione V(D)J coinvolta nella generazione di traslocazioni cromosomiche. Ciò è stato dimostrato in varie linee di linfoma di Burkitt sporadico, successivamente infettate con EBV e in cui il virus risulta non a caso sempre integrato nel genoma cellulare; l'induzione dell'espressione di RAG1 e 2 sembra essere sotto il controllo di EBNA1 (Srinivas et al., 1995).

Nel nostro laboratorio è stato visto che l'infezione con EBV di cellule BL41 viene a causare instabilità genomica producendo un aumento dei livelli di perossidi endogeni, cioè creando stress ossidativo; l'instabilità genomica, misurata attraverso la formazione di micronuclei, risulta infatti ridotta da trattamenti antiossidanti nella linea cellulare EBV+ denominata E2 (Gualandi et al., 2001). Cerimele F. e colleghi hanno trovato che in varie linee cellulari di linfoma di Burkitt EBV positive, l'infezione virale risulta oltre che in un'attivazione della via delle MAPK (mitogen-activated protein kinase) in un incremento nelle specie reattive dell'ossigeno (ROS); secondo questi autori i ROS possono aumentare con due diversi meccanismi: nella latenza di tipo I viene indotta interleuchina 10 che produce ossidazione; invece nella latenza di tipo III i ROS aumentano attraverso LMP1 che risulta sotto il controllo trascrizionale di EBNA2; quindi ROS e MAPK regolerebbero eventi più a valle nella vie di trasduzione del segnale come l'attivazione di NF-kB. (Cerimele et al., 2005).

EBNA1 oltre ad essere necessaria per la replicazione virale e per il mantenimento dell'episoma è un attivatore trascrizionale che regola positivamente il promotore Cp e di LMP1. Anche EBNA2 è una fosfoproteina che agisce come attivatore trascrizionale di geni cellulari e virali quali il CD21, il CD23, LMP1 e LMP2 e del gene c-myc. Per quel che riguarda la famiglia degli EBNA3, sembra che solo EBNA3A ed EBNA3C siano essenziali per la trasformazione delle cellule B in vitro; anche queste proteine hanno un'attività regolatoria sulla trascrizione: EBNA3C regola positivmente CD21 ed LMP1, reprime il promotore Cp e può interagire con pRb nel promuovere la trasformazione; le proteine EBNA3 reprimono in generale la trans-attivazione mediata da EBNA2 (Young and Murray, 2003).

Ma una delle principali proteine trasformanti del virus di EB è LMP1 che quando è espressa dalle cellule esibisce effetti pleiotropici regolando in maniera coordinata la proliferazione e controllando l'apoptosi. LMP1 induce l'espressione di molecole di adesione di superficie, up-regola proteine antiapoptotiche quali Bcl-2 e A20 e stimola la produzione di citochine quali le interleuchine 8, 6 e 10. LMP1 assomiglia funzionalmente al recettore CD40 della superfamiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale (TNFR) ed è quindi una proteina integrale di membrana. In particolare due distinti domini funzionali nella regione carbossiterminale della proteina, detti CTAR1 e CTAR2, sono in grado di attivare la via del fattore trascrizionale NF-kB (Chair-McFarland et al., 2004; Atkinson et al., 2003). Abbiamo gia sottolineato come LMP1 sia pure in grado di attivare la via delle MAPK (ERK, JNK e P38); in particolare attraverso l'attivazione della via di p38/SAPK2 è indotta l'espressione di interleuchina 10 (Vockerodt et al., 2001). LMP1 regola inoltre la via di segnalazione della

fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K/Akt) causando particolari cambiamenti morfologici correlati con la trasformazione neoplastica come il rimodellamento dei filamenti di actina (Dawson et al., 2003). Ancora LMP1 attiva trascrizionalmente c-myc attraverso la via di JAK/STAT e causa una diretta stimolazione dei membri della famiglia di AP-1 (Dirmeier et al., 2005).

Il gene LMP2 codifica per due distinte proteine LMP2A ed LMP2B; si tratta di due proteine molto simili costituite di dodici domini trans-membrana e con una coda carbossiterminale di 27 amminoacidi. LMP2A è dotata in più di un dominio amminoterminale di 119 amminoacidi dove è presente un motivo di attivazione basato su tirosine (TAM) che lega efficientemente le proteine della famiglia src e con cui viene regolata negativamente l'attività di proteine tirosin-chinasi e la segnalazione del BCR; ciò favorisce il mantenimento della latenza contro il ciclo litico. LMP2A può risultare inoltre fosforilata su residui di serina e treonina e può interagire con la via delle MAPK. ERK e JNK risultano in particolare fosforilate in linee epiteliali transfettate per LMP2A con conseguente attivazione del fattore di trascrizione c-jun (Chen et al., 2002).

Nella linea cellulare di linfoma di Burkitt denominata Ramos e in cellule di carcinoma gastrico HSC-39 transfettate con LMP2A, tale fattore virale incrementa la vitalità cellulare dopo trattamento con TGFβ1 attraverso l'attivazione della via PI3-K/Akt (Fukuda and Longnecker, 2004). E' stato inoltre visto che LMP2A interviene nella sopravvivenza di di cellule B negative al BCR attraverso l'attivazione costitutiva della via di Ras/PI3K/Akt e che ciò corrisponde ad una over-espressione di Bcl-XL e alla fosforilazione di Bcl-2 (Portis and Longnecker, 2004). E' quindi soprattutto LMP2A ad interferire con varie vie di trasduzione del segnale, mentre per LMP2B è stato supposto un ruolo regolatorio sulle funzioni di LMP2A.

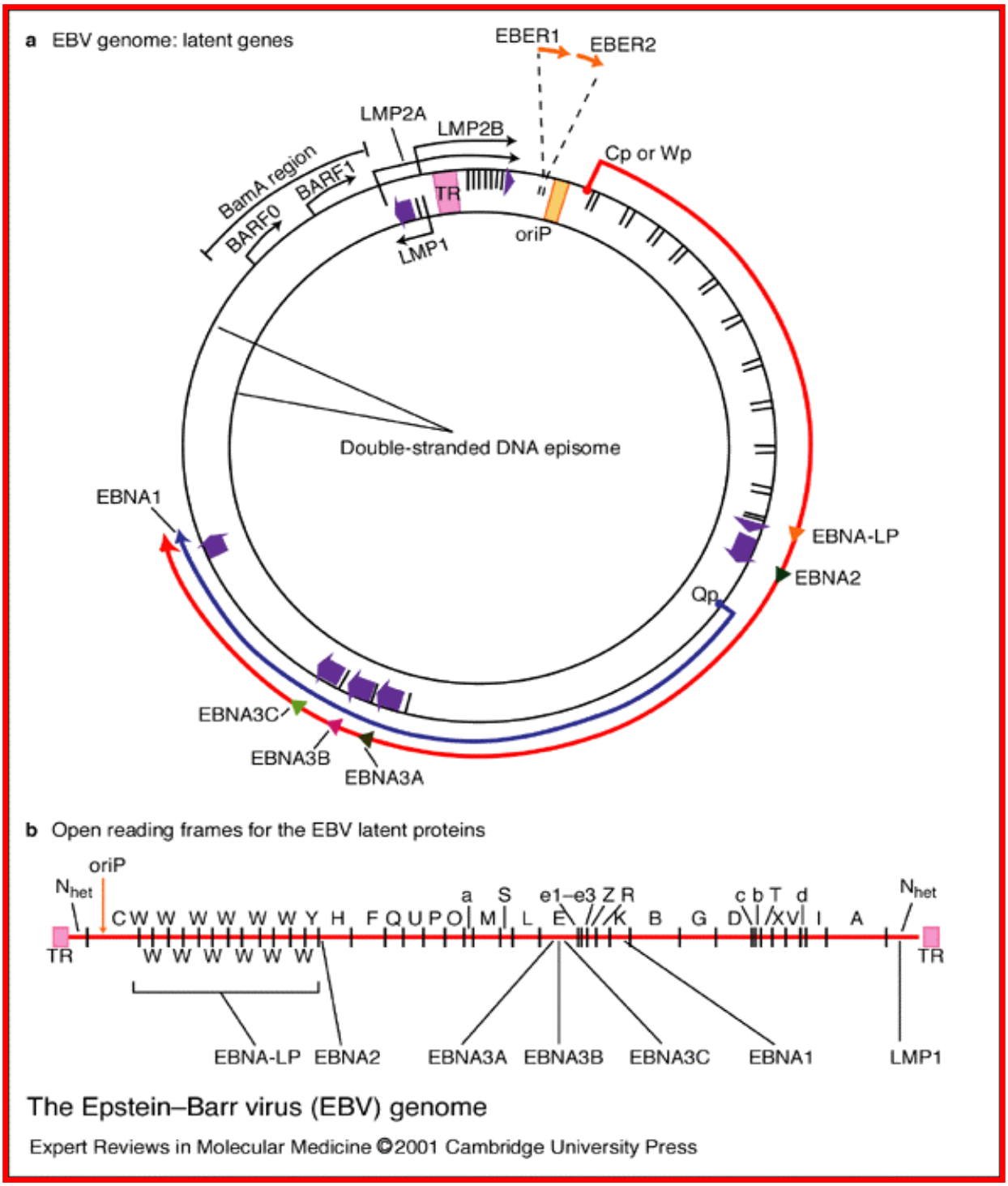


Figura 1: Schema del genoma del Virus di Epstein Barr e dei geni della latenza

EBNA-LP è uno dei primi geni virali ad essere espresso insieme ad EBNA-2 nelle cellule B infettate da EBV e contiene copie multiple di un dominio ripetuto ammino-terminale di 66 amminoacidi codificato dai due esoni W1 e W2 ed un unico dominio carbossi-terminale di 45 amminoacidi codificato dagli esoni Y1 e Y2. Sia i domini ripetuti che il dominio singolo contengono dei residui di serina che sono un facile bersaglio in eventi di fosforilazione regolati dal ciclo cellulare (Kitay and Rowe, 1996). EBNA-LP interviene nella trasformazione indotta dal virus innanzitutto agendo come attivatore trascrizionale di EBNA-2 nell'espressione di LMP1 e della ciclina D2 (McCann et al., 2001; Peng et al., 2005). Inoltre EBNA-LP interagisce con un certo numero di proteine cellulari: pRb, p53, Bcl-2, Hsp70 ed altre; sebbene il significato di queste interazioni sia spesso poco chiaro sicuramente EBNA-LP è una proteina multifunzionale che modula varie componenti del macchinario cellulare per una più efficiente trasformazione; ancora EBNA-LP induce le chemochine cellulari TARC (Kanamori et al. 2004) e inibisce la scissione dei pre-mRNA e la loro poliadenilazione.

Ma i più abbondanti trascritti virali, espressi in tutti i tumori associati ad EBV e in cellule infettate latentemente sono gli EBER 1 e 2 (EBV-encoded small RNAs) dei piccoli RNA non poliadenilati che non vengono tradotti in proteine. EBER1 ed EBER2 sono lunghi rispettivamente 167 e 172 nucleotidi e sono trascritti dalla RNA polimerasi III. Vari studi pionieristici sono stati fatti da Takada e colleghi utilizzando linee cellulari di linfoma di Burkitt denominate Akatata EBV positive e con le corrispondenti isogeniche EBV negative a dimostrazione del ruolo degli EBERs nell'oncogenesi (Nambo and Takada, 2002). Gli EBERs presenti nelle cellule infettate sia nei nuclei sia nel citoplasma, formano complessi con varie proteine cellulari come le protein chinasi PKR attivate da RNA, proteine chiave

che mediano la risposta cellulare alle infezioni virali attraverso l'interferone. Gli EBERs competono con i dsRNA per il legame a PKR sopprimendone l'attività e quindi in particolare bloccando la fosforilazione del fattore di inizio della traduzione eIF-2α e il conseguente arresto della sintesi proteica; un'altra proteina che viene fosforilata da PKR è IκBα.

Quindi in cellule di linfoma di Burkitt è stato visto che gli EBERs conferiscono resistenza all'apoptosi indotta da IFN-α proprio attraverso il legame a PKR (Nambo et al., 2002). Gli EBERs possono indurre l'espressione di fattori di crescita cellulari come la IL-10 nelle cellule B e intervengono nella trasformazione cellulare incrementando in generale il potenziale di crescita delle cellule infettate (Yajima et al., 2005).

3. Linfomi e resistenza ai trattamenti chemioterapici

Il trattamento dei linfomi B fa uso di particolari protocolli chemioterapeutici, caratterizzati dalla somministrazione di alte dosi di farmaci con effetti tossici; le risposte sono parziali, si osservano solo nel 30-40% dei pazienti e sono spesso accompagnate da successive ricadute dovute all'emergere di varianti resistenti.

Sia nel caso del linfoma follicolare, sia nel caso del DLBCL (che rappresentano rispettivamente le forme più frequenti di linfomi indolenti e aggressivi) uno degli schemi terapeutici più applicati e il CHOP a base di ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone (Coffey et al., 2003).

Nell'ambito dei linfomi follicolari la terapia di prima linea con CHOP e stata messa a confronto con un regime FCM a base di fludarabina, ciclofosfamide e mitoxantrone;

quest'ultima strategia di cura si è rivelata superiore in termini di risposta completa, sia clinica sia molecolare, rispetto alla prima.

L'introduzione nella chemioterapia degli analoghi delle purine, come la fludarabina, ha portato buoni successi anche nella cura della LLC-B, con un incremento dei pazienti che va in remissione completa mediante monochemioterapia a base di fludarabina rispetto alla somministrazione dell'agente alchilante clorambucile, comunemente usato; anche nella LLC sono state inoltre ottenute migliori risposte mediante la combinazione di agenti citotossici come il mitoxantrone e il ciclofosfamide con la fludarabina.

Considerato che i risultati del trattamento a lungo termine con il regime CHOP si sono dimostrati insufficienti per la cura dei linfomi, soprattutto nei pazienti con indice prognostico più sfavorevole, si è cercato di modificare le strategie terapeutiche per ottenere una diminuzione del numero di recidive e un aumento delle remissioni complete. Grossi passi in avanti sono stati fatti aggiungendo nuovi farmaci con diverso meccanismo d'azione ai programmi chemioterapeutici convenzionali e tra i composti innovativi un ruolo importatnte è sicuramente svolto dagli anticorpi monoclonali.

Gli anticorpi monoclonali si dividono in tre classi: anticorpi monoclonali non coniugati (e in questo caso è l'anticorpo stesso che media la morte cellulare), anticorpi monoclonali coniugati con una immunotossina e anticorpi monoclonali coniugati con un radioisotopo. Ad essere utilizzati sono soprattutto gli anticorpi monoclonali non coniugati e tra questi il Rituximab.

Il Rituximab è un anticorpo che lega il CD20, una proteina di superficie presente sui linfociti B; l'anticorpo è costituito da una immunoglobulina IgG umana nella quale la regione che lega il CD20 è derivata da un anticorpo monoclonale murino (anticorpo chimerico): in tutti i casi in cui il rituximab è stato accoppiato alla chemioterapia nel FL,

nel DLBCL, nella LLC, si sono ottenuti risultati superiori in termini di sopravvivenza e qualità della vita e si è potuto ottenere una completa remissione molecolare.

Il rituximab è stato anche adottato per ottenere 'purging' in vivo in pazienti sottoposti a chemioterapia ad alte dosi e in attesa di autotrapianto di midollo, per superare la quella limitazione al trapianto che è rappresentata dalla localizzazione midollare dei linfomi indolenti (LF, MCL) e dal conseguente rischio di reinfondere, dopo terapie mieloablative, cellule staminali contaminate da cellule tumorali.

Bisogna considerare che le remissioni e la resistenza alla chemioterapia sono il risultato di un sempre più elevato accumulo di alterazioni genetiche e molecolari delle cellule tumorali; alcune alterazioni coinvolgono la complessa rete di vie di trasduzione del segnale con cui la cellula integra gli stimoli ed i messaggi provenienti dall'ambiente esterno, con conseguente aumento della sopravvivenza e della proliferazione cellulare mentre talvolta si possono verificare blocchi nelle vie esecutrici del processo apoptotico.

3.1 Alterazioni nelle vie di trasduzione del segnale

3.1.1 Vie delle Protein-chinasi attivate dai mitogeni (MAPK): **Le MAPK sono delle serin-treonin-chinasi che mediano importanti segnali regolatori nelle cellule e che dopo stimolazione fosforilano specifici substrati su residui di serina e/o treonina; tale fosforilazione può regolare positivamente o negativamente il substrato e quindi l'attività dell'intera cascata di segnali. Esistono tre famiglie di MAPK: le chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK), le chinasi JNK (c-jun NH2-terminal chinasi), e le p38-Map chinasi (Wada and Penninger, 2004). La realizzazione della cascata di segnali dipendenti dall'attivazione delle vie delle**

MAPK gioca un ruolo molto importante nella regolazione dell'apoptosi e della crescita delle cellule maligne del sistema ematopoietico. In particolare è oramai chiaro che la via di Raf/Mek/ERK partecipa alla generazione di risposte mitogeniche nelle leucemie croniche e acute (Barragàn et al. 2003) nei linfomi e nel mieloma. Gli effetti regolatori delle vie di JNK e di p38 MAP-chinasi possono invece variare in dipendenza dello specifico tipo cellulare e delle particolari isoforme coinvolte (Platanias, 2003). In realtà esistono difficoltà nello studiare il ruolo che le alterazioni in tali vie di trasduzione comportano nella patogenesi dei linfomi e nella resistenza alla chemioterapia partendo da campioni primari e i pochi studi a disposizione sono stati fatti su linee cellulari.

La via di Raf-1/Mek/ERK è coinvolta nella inibizione Ras mediata dell'espressione di Fas e quindi nel promuovere sopravvivenza in cellule di linfoma; così l'inibizione di MEK induce espressione di Fas e apoptosi (Kalas et al. 2002). Il ruolo della via di MEK/ERK nel regolare la crescita e la sopravvivenza è stato dimostrato in cellule di HD dove risulta espresso in maniera aberrante p-ERK; l'inibizione di MEK, mediante il composto denominato U0126, causa un decremento nei livelli di p-ERK, di Bcl-2 e Mcl-1, inducendo morte cellulare, arresto del ciclo cellulare nella fase G_2M e potenziando gli effetti di morte di APO2L/TRAIL e della chemioterapia. Nelle cellule di Reed-Sternberg l'attivazione della via di sopravvivenza di MEK/ERK sembra essere dovuta all'espressione di recettori della famiglia del TNF come il CD30, il CD40 e RANK e l'uso di specifici inibitori di MEK potrebbe fornire nuove strategie di cura (Zheng et al. 2003). Il TNF-α induce proliferazione in linee cellulari di leucemia e linfoma attraverso sia l'attivazione di NF-kB, ma anche attivando la via di p38/MAPK (Liu et al., 2000). Una aumentata espressione della forma fosforilata della p38MAPK e

stata trovata nei linfomi follicolari e nel DLBCL e non in cellule benigne dei centri germinativi e l'inibitore di p38MAPK denominato SB203580 induce in apoptosi linee di FL t(14;18)+/p38MAPK+; ciò suggerisce che anche questa via potrebbe diventare un bersaglio molecolare in strategie terapeutiche mirate nel FL (Elenitoba-Johnson et al., 2003).

Al contrario l'attivazione di JNK sembra essere correlata ad induzione di apoptosi, in particolare nel mieloma multiplo. E' stato visto che l'inibitore di JNK, denominato SP600125, induce attivazione di NF-kB conseguente a fosforilazione del IkB chinasi alpha e alla sua successiva degradazione; in questo caso la fosforilazione di JNK agirebbe contrastando l'attivazione costitutiva di NF-kB (Hideshima et al., 2003). Secondo Chauhan e colleghi nel MM, JNK fosforilata trasloca dal citosol ai mitocondri con successivo rilascio di Smac e attivazione della morte cellulare.

E' stato tuttavia dimostrato che tipici substrati di JNK, come i fattori di trascrizione c-jun e Jun-B, sono espressi in maniera aberrante in colture primarie di linfoma di Hodgkin con conseguente attivazione costitutiva di AP1 e della proliferazione cellulare (Mathas et al. 2002).

Altre ricerche sono quindi necessarie per meglio caratterizzare il ruolo funzionale che le diverse isoforme di MAPK giocano nella patogenesi dei linfomi; le varie isoforme all'interno di ogni gruppo potrebbero avere vari isotipi con differenti proprietà e spesso con effetti biologici opposti. I pochi dati finora disponibili sono incoraggianti circa l'uso di inibitori farmacologici sempre più specifici delle varie proteine delle vie delle MAPK in 'trials' clinici, soprattutto in combinazione con altri farmaci. Per esempio inibitori di Mek potrebbero essere usati insieme ad inibitori del ciclo cellulare per il trattamento di leucemie e del mieloma multiplo o in combinazione con inibitori di Bcl-2 nel

trattamento delle leucemie acute refrattarie. Altre sperimentazioni cliniche sono state intraprese in pazienti con mieloma multiplo mediante inibitori della p38/MAPK.

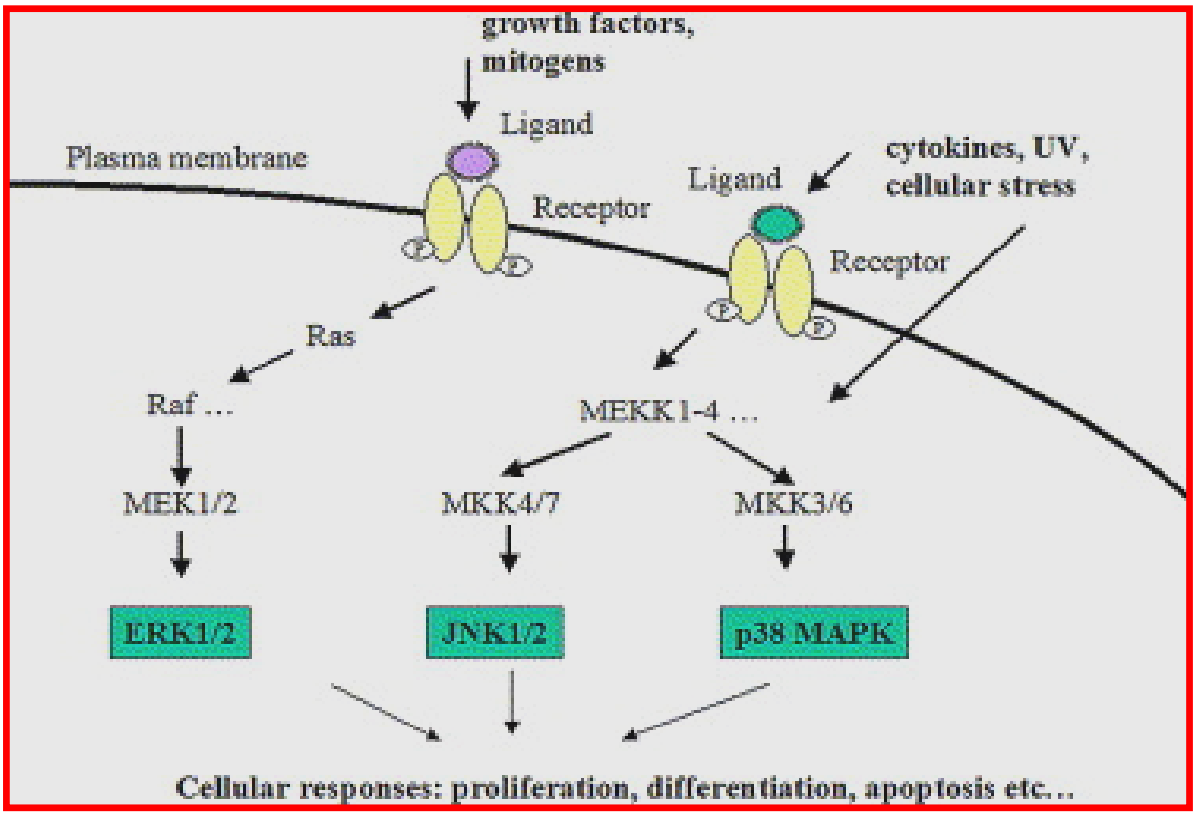


Figura 2: Vie di trasduzione delle MAPK (mitogen activated protein kinase): fattori di crescita e mitogenici stimolano la via di MEK/ERK mediante complessi recettoriali di membrana e l'attivazione di Ras e Raf; le vie di JNK e p38MAPK possono essere stimolate da citochine, attraverso recettori di membrana, o da agenti stressanti; le risposte cellulari differiscono e se l'attivazione della via di MEK/ERK è sempre associata a proliferazione cellulare, la risposta all'attivazione delle SAPK (JNK p38MAPK) differisce a seconda del sistema cellulare preso in considerazione e può essere associata a proliferazione o ad induzione di apoptosi.

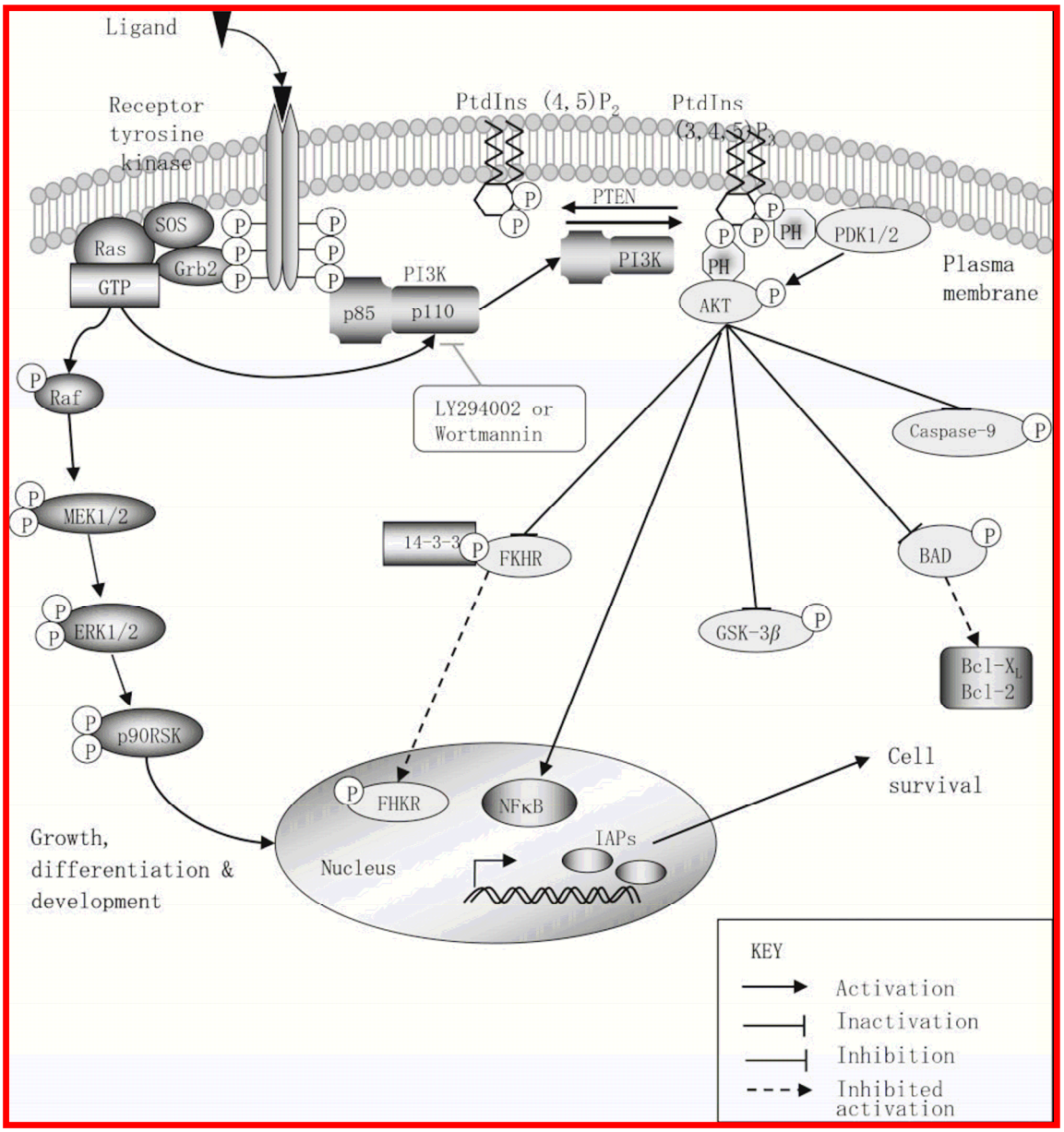


Figura 3: Via della PI3K/Akt : questa via integra segnali provenienti da recettori tirosin-chinasici con il 'network' apoptotico; la PI3K chinasi è costituita da una subunità catalitica p110 e da una subunità regolatoria p85; può essere attivata da uno stimolo recettoriale mediante il CD40 o il BCR nei linfociti B o da una citochina e sua volta fosforila Akt. Akt fosforilata contribuisce a numerose risposte cellulari fosforilando a sua volta almeno 50 diversi substrati. Tra questi substrati ricordiamo Bad, la caspasi 9, le proteine GSK-3 e mTOR (mammalian target of rapamicin). La fosforilazione di Akt comporta anche l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB.

3.1.2 Via della Fosfotidilinositolo 3-chinasi/Akt : considerato che l'apoptosi è controllata da una complessa rete di geni di proliferazione e sopravvivenza cellulare spesso alterati nell'evoluzione di un tumore, un sempre più crescente interesse è suscitato dal ruolo svolto nella linfomagenesi dalla via della PI3K/Akt; tale via integra segnali provenienti da recettori cellulari tirosin-chinasici stimolati da fattori di crescita, con il 'network' apoptotico. La PI3K consiste di una subunità catalitica di 110 KD e di una subunità regolatoria ad essa strettamente associata p85 e nelle cellule B è implicata in varie vie di trasduzione del segnale come quella del CD40 e del BCR. E' stato visto, per esempio, che in cellule di mieloma multiplo esistono diverse modalità con cui la IL-6 può attivare la via della PI3K/Akt: una attraverso Ras e indipendente da p85 ed una dipendente da p85 e dalla formazione di complessi tra questa proteina e STAT-3 (Hsu et al., 2004). Gli effetti più a valle dell'attivazione della PI3K sono mediati dalle protein chinasi Akt, una famiglia di proteine presenti in tre isoforme (PKBα/c-Akt, PKBβ/c-Akt2, PKBγ/c-Akt3) che risultano molto conservate tra gli eucarioti da *C. elegans* all'uomo e che sono state identificate la prima volta come omologhe di un oncogene retrovirale. Le proteine Akt contribuiscono ad una varietà di risposte cellulari; infatti più di 50 diversi substrati putativi sono stati identificati come bersagli (Hanada et al., 2004) e mutazioni che attivano tale via, quali amplificazioni dei vari componenti o inattivazioni dei regolatori negativi PTEN (fosfatasi che regolano negativamente la PI3K) sono comuni in varie neoplasie.

Uno dei bersagli più diretti di Akt nel promuovere effetti antiapoptotici sembra essere BAD, che se fosforilato si dissocia dai complessi Bcl2/Bcl-XL associandosi invece a proteine citosoliche antiapoptotiche dette PED/PEA-15; inoltre Akt può fosforilare la

pro-caspasi 9 bloccando quindi l'attivazione, indotta per scissione catalitica dal citocromo c, della stessa proteina; ancora può determinare attivazione di NF-kB.

Akt promuove la sopravvivenza cellulare attraverso la fosforilazione e l'inibizione delle proteine GSK-3; le proteine GSK-3 fosforilano, se attive, substrati quali la glicogeno sintasi, la ciclina D e c-myc inattivandoli; un altro importante target di Akt è mTOR (mammalian target of rapamicin) che regola la traduzione delle proteine attraverso la fosforilazione di substrati quali la chinasi p70 S6 e il fattore 4E-BP1. Esperimenti sono stati fatti in vivo usando particolari modelli di linfoma B, in topo, a dimostrazione che sistemi over-esprimenti Akt danno vita a linfomi molto invasivi, spesso associati a leucemia, con un immunofenotipo mancante di marcatori di differenziamento e molto resistenti alla chemioterapia. In questi casi Akt sembra attivare la sopravvivenza cellulare tramite mTOR; infatti la rapamicina causa una riduzione nella fosforilazione della proteina ribosomale S6 (che viene fosforilata dalla chinasi S6) e di eIF4G.

Pur non essendo da sola in grado di indurre apoptosi la rapamicina mostra una potente azione chemoterapeutica in combinazione con altri farmaci come la deoxirubicina (DXR). Quindi gli effetti di mTOR sono collegati ad una deregolazione della traduzione, probabilmente attraverso un alterato reclutamento di mRNA pro-apoptotici o antiapoptotici ai polisomi; infatti eIF4E è in grado di accelerare la linfomagenesi con effetti molto simili a quelli di Akt (Wendel et al., 2004).

Un attivazione costitutiva di Akt e di suoi effettori a valle come mTOR è stata inoltre dimostrata in linee cellulari e in campioni primari di linfoma di Hodgkin; anche in questi casi viene suggerito l'uso della rapamicina in combinazione con DXR nel trattamento del LH (Dutton et al. 2005).

Abbiamo già sottolineato che la via di trasduzione del segnale della PI3K/Akt risulta costitutivamente attivata anche in sistemi cellulari B che esprimono le proteine LMP1 o LMP2A del virus di EB. La stessa via risulta costitutivamente attiva anche in cellule di linfoma PEL (primary effusion linfoma); in questo ultimo caso inibire la via della PI3K/Akt, attraverso la sostanza denominata LY294002, viene ad indurre apoptosi attraverso rilascio del citocromo c dai mitocondri, attivazione delle caspasi 3 e 9 e down-regolazione dell'inibitore dell'apoptosi X-IAP; nuovi studi preclinici e clinici sono necessari per chiarire il potenziale uso di simili inibitori nel trattamento dei linfomi (Uddin et al., 2005).

3.1.3 NF-kB: i fattori di trascrizione della famiglia Rel/NF-kb svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria, della proliferazione, della sopravvivenza cellulare e dell'apoptosi; numerose evidenze coinvolgono tali fattori nell'oncogenesi ed in particolare nella linfomagenesi (Baldwin, 2001).

Nelle cellule di mammifero esistono cinque proteine Rel appartenenti a due diverse classi. La prima include RelA (p65), RelB e c-Rel che sono sintetizzate come prodotti già maturi e caratterizzate dalla presenza di un dominio di omologia Rel amminoterminale (RHD) richiesto per il legame al DNA, la dimerizzazione, la localizzazione nucleare e il legame agli inibitori IkB; tali fattori presentano inoltre sequenze carbossiterminali contenenti domini di attivazione trascrizionale.

La seconda classe di proteine Rel comprende NF-kB1 (p50) e NF-kB2 (p52), sintetizzate come precursori p105 e p100 rispettivamente; tali proteine presentano, oltre ad un dominio RHD, un dominio carbossiterminale ripetuto anchirinico e richiedono un processamento proteolitico, dipendente da ubiquitina, per rimuovere tale porzione

proteica e per raggiungere la forma attiva (mancante quindi di domini di modulazione della trascrizione).

I fattori Rel/NF-kB possono formare omodimeri ed eterodimeri e legandosi a specifiche sequenze sul DNA, i siti kB, possono regolare la trascrizione di numerosi geni: importanti geni bersaglio di NF-kB sono quelli codificanti proteine antiapoptotiche come TRAF1 e 2 , c-IAP 1 e 2 ed XIAP (Munzert et al., 2002).

L'attività dei dimeri Rel/NF-kB deve essere quindi altamente controllata e ciò si verifica prima di tutto per mezzo dell'interazione con la famiglia delle proteine IkB; queste ultime sequestrano i complessi dimerici nel citoplasma, non permettendone il legame al DNA. Varie vie di trasduzione integrano segnali sul complesso dell'IkB chinasi (IKK) con conseguente fosforilazione, ubiquitinazione e degradazione proteosomica delle IkB; i dimeri sono così liberi di entrare nel nucleo e di legare i promotori dei geni bersaglio (Viatour et al. 2005).

I membri della famiglia Rel/NF-kB sono espressi differentemente nelle varie fasi del differenziamento e della crescita delle cellule B (Gilmore et al., 2004). In particolare c-Rel, l'unico membro la cui espressione è ristretta solo alle cellule del sistema ematopoietico, è presente in tutti gli stadi dello sviluppo delle cellule B, e soprattutto nelle cellule B mature. Il complesso p50/p65 è principalmente indotto nelle cellule pre-B, mentre le cellule B mature presentano soprattutto dimeri p50/c-Rel ma anche dimeri p50/p65, omodimeri c-Rel/c-Rel ed eterodimeri c-Rel/p65 (Feng et al. 2004) .

Studi di 'knockout' genico hanno dimostrato che c-Rel e RelA (p65) hanno essenziali ma ridondanti funzioni nello sviluppo delle cellule B mature e topi 'knockout' per c-Rel presentano più elevati livelli di p50/RelA nelle loro cellule B a compensazione della perdita di c-Rel. Ognuno dei diversi complessi dimerici regola geni bersaglio unici ed

importanti per le funzioni delle cellule B. Per esempio gli eterodimeri c-Rel/p50 regolano c-myc e la crescita cellulare; gli omodimeri c-Rel/c-Rel regolano la sopravvivenza attraverso Blf-1/A1 e BclX e la proliferazione attraverso la ciclina D3; ancora c-Rel/RelA regola la sopravvivenza attraverso Bcl-2.

I diversi complessi dimerici, sono nella loro forma inattiva nel citosol della cellula B fino a quando non si verifica stimolazione antigenica (BCR) o attraverso il CD40 e altri complessi recettoriali e le vie di trasduzione del segnale che convergono sui complessi Rel/NF-kB coinvolgono molecole segnale come le proteine della via di PI3K/Akt o ancora i domini CARD delle proteine Bcl-10 e Carma-1 o isoforme delle protein chinasi C (Lucas et al. 2004; Moscat et al 2003; Patke et al. 2004).

Particolarmente importante per l'oncogenesi dei linfomi sembra essere c-Rel, l'analogo del gene virale v-Rel; quest'ultimo causa rapidamente leucemie e linfomi B fatali in giovani polli; degno di nota è il fatto che gli altri membri della famiglia (p50, p52, RELA e RELB) non mostrano simile attività trasformante sulle cellule linfoidi.

Alterazioni genetiche nei geni REL/NF-KB e IKB sono state trovate in diversi tipi di cancro e in linee cellulari tumorali. Tali alterazioni includono amplificazioni, riarrangiamenti cromosomici, delezioni e mutazioni puntiformi (Gilmore et al., 2002).

Amplificazioni dei geni REL sono osservate in numerosi tipi di LNH e cioè in circa il 15-20% dei casi di DLBCL (Houldsworth et al., 2004), nel 15-20% dei casi di linfoma follicolare e nel 40-50% dei casi di linfoma di Hodgkin classico.

Esperimenti di espressione mediante cDNA 'microarray' hanno permesso di suddividere i casi di DLBCL in vari sottotipi; in alcuni casi si osserva un pattern di espressione simile a quello di cellule B dei centri germinativi (GCB-DLBCL), e questi tumori sono caratterizzati da una migliore prognosi; in altri casi il linfoma presenta un

pattern di espressione genica simile a quello di cellule B attivate (ABC-DLBCL) e tali casi hanno prognosi più sfavorevole (Alizadeh et al., 2000). Nei linfomi del tipo ABC, un certo numero di geni target di NF-kB, geni per citochine, chemochine e fattori antiapoptotici, risultano espressi a dimostrazione dell'attivazione costitutiva di tale via, mentre l'espressione, mediante trasduzione virale, di una forma non degradabile del super-repressore di IKBα risulta tossica sui linfomi di tipo ABC, a differenza di ciò che si osserva nei linfomi del tipo GCB (Davis et al., 2001).

Anche il linfoma MALT è associato a deregolazione di NF-kB; in particolare la t(11:18), che si verifica nel 18-35% dei casi di tale linfoma, giustappone il gene API2 delle IAP, presente sul cromosoma 11, al gene MLT (MALT lymphoma-associated traslocation) sul cromosoma 18; la proteina di fusione API2/MALT1 è in grado di attivare IKK. Altre traslocazioni presenti nel linfoma MALT sono la t(1:14) che porta l'intera sequenza codificante il gene Bcl-10 sotto il controllo del locus IGH e la t(14:18) che risulta in un riarrangiamento IGH-MLT. BCL-10 presente nelle cellule B normali nel citosol, in cellule di linfoma MALT si ritrova traslocata nei nuclei anche in assenza della t(1:14). Bcl-10 normalmente attiva NF-kB attraverso il legame a MALT1 e la successiva attivazione del complesso IKK, ma BCL-10 può legare anche il prodotto di fusione API2-MALT1(Kuo et al., 2004).

Riarrangiamenti cromosomici dei geni REL o NFkB2 possono portare alla produzione di proteine c-rel o p100 con la regione carbossiterminale troncata; tali proteine sono costitutivamente nucleari e hanno un'aumentata attività transattivante.

Talvolta le aberrazioni cromosomiche causano una over-espressione di proteine tipo IKB come Bcl-3: è questo il caso della t(14:19) nella leucemia linfocitica cronica.

Sebbene correlato alle proteine IKB, Bcl-3 è anche considerato un co-attivatore trascrizionale che può associarsi con gli omodimeri p50 e p52.

Riarrangiamenti cromosomici sono stati osservati anche in casi di linfoma di Hodgkin classico: sono state osservate sia traslocazioni del gene REL in una posizione vicina agli enhancers delle catene immunoglobuliniche leggere, sia alterazioni nell'estremità 3' di REL che portano alla produzione di una proteina con la regione C-terminale troncata (Barth et al., 2003). Le cellule di Reed–Sternberg (RS) del linfoma di Hodgkin sono un classico esempio di de-regolazione di NF-kB: infatti sia linee cellulari, sia campioni primari hanno complessi p50/RelA e p50/c-Rel costitutivamente attivi e nucleari come conseguenza di mutazioni inattivanti nel gene IKBA.

L'inibizione di NF-kB esibisce effetti antiproliferativi e pro-apoptotici in vari tipi di linfoma, come nel mieloma multiplo, nel linfoma di Burkitt (Mitsiades et al. 2002; Piva et al. 2005); ciò suggerisce un potenziale uso di inibitori di NF-kB in nuovi protocolli chemioterapeutici. Particolarmente utilizzati nel trattamento dei linfomi sono gli inibitori del proteosoma come il PS-341, il bortezomib, la lactacistina.

La lactacistina è stata utilizzata nel DLBCL, il bortezomib in 'trial' clinici nel mieloma multiplo, nel linfoma follicolare e nel mantellare; PS-341 o l'inibitore di IKBα BAY 11-7082 sono stati utilizzati nel MCL; sono inoltre in corso sperimentazioni cliniche in cui il bortezomib è provato in combinazione con il protocollo EPOCH (etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide e doxorubicin) in vari NHL (Hachem and Gartenhaus, 2005). Tra l'altro uno dei ritrovati di maggiore successo nella cura dei linfomi, il Rituximab (l'anticorpo monoclonale chimerico contro il CD20) sensibilizza cellule di LNH all'apoptosi indotta da altri farmaci, come il Paclitaxel, proprio attraverso l'inibizione del nostro fattore trascrizionale (Jazirehi et al., 2005).

Infine, come è stato gia sottolineato, l'attivazione di NF-kB nei linfomi è molto spesso collegata all'oncogenesi virale: numerosi virus sintetizzano proteine che attivano tale fattore trascrizionale e tra questi il virus di EB (Santoro et al. 2003; Cahir-McFarland et al. 2000; Feuillard et al.2000).

3.2 Alterazioni nelle vie apoptotiche

L'insieme dei processi e il macchinario che portano all'esecuzione dell'apoptosi e decidono del destino di vita o di morte di una cellula sono altamente controllati e regolati e svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi dei tessuti ma anche nel corretto funzionamento del sistema immunologico; dalla comprensione dei componenti principali del macchinario apoptotico, a livello molecolare e strutturale, e delle eventuali alterazioni nel cancro, deriva l'elaborazione di potenziali nuove terapie per le leucemie e i linfomi (Sánchez-Beato et al., 2003; Reed and Pellecchia , 2005).

In genere le vie apoptotiche sono suddivise in vie estrinseche ed intrinseche che convergono nell'attivazione di caspasi effettrici quali la caspasi 3 e la caspasi 7.

Segnali pro-apoptotici sono mediati, nella via estrinseca, attraverso recettori di superfice detti di morte come il TNFR1 (tumor necrosis factor 1), Fas, DR3-4-5 e 6 (death receptor); una volta attivati dai loro ligandi tali recettori reclutano molecole adattatrici che a loro volta reclutano la procaspasi 8 con conseguente formazione del DISC (death inducing signaling complex).

La via intrinseca è regolata per mezzo di particolari proteine, che agiscono come sensori intracellulari, le proteine della famiglia di Bcl-2; tale via comporta la formazione di un altro complesso, l'apoptosoma, costituito dalla pro-caspasi 9, da Apaf1 e dal citocromo

c, quest'ultimo liberato dai mitocondri. Numerose altre proteine intervengono nel processo apoptotico regolandolo e tra queste particolarmente importanti sono le IAP (inhibitor of apoptosis proteins) e Smac (second mitochondria derived activator of caspases).

E' noto inoltre che la via estrinseca ed intrinseca comunicano tra di loro attraverso proteine della famiglia di Bcl-2 tipo Bid e che ciò può dare origine a 'loop' di amplificazione del processo apoptotico. Anche da una debole attivazione della caspasi 8 può essere direttamente scisso Bid; ciò dà origine ad un frammento carbossiterminale di questa proteina denominato tBid (15kDa) che a sua volta causa la traslocazione ai mitocondri di proteine pro-apoptotiche della famiglia di Bcl-2, come Bax e Bak e l'attivazione della via mitocondriale.

A proposito del ruolo dell'apoptosi nella fisiologia delle cellule B basti pensare ai processi selettivi che si verificano ai centri germinativi durante l'ipermutazione somatica: in particolare la via estrinseca di FasL-Fas gioca un ruolo fondamentale per l'eliminazione delle cellule B autoreattive, mentre la sopravvivenza e la selezione positiva dei cloni B specifici nel riconoscimento antigenico prevede la partecipazione della via intrinseca ovvero l'attivazione del BCR, la stimolazione da parte di citochine infiammatorie e la co-stimolazione ad opera di complessi quali il CD19/CD21 e il CD40/CD154; tali stimoli inducono le proteine antiapoptotiche della famiglia di Bcl-2 (Rossi and Gaidano, 2003).

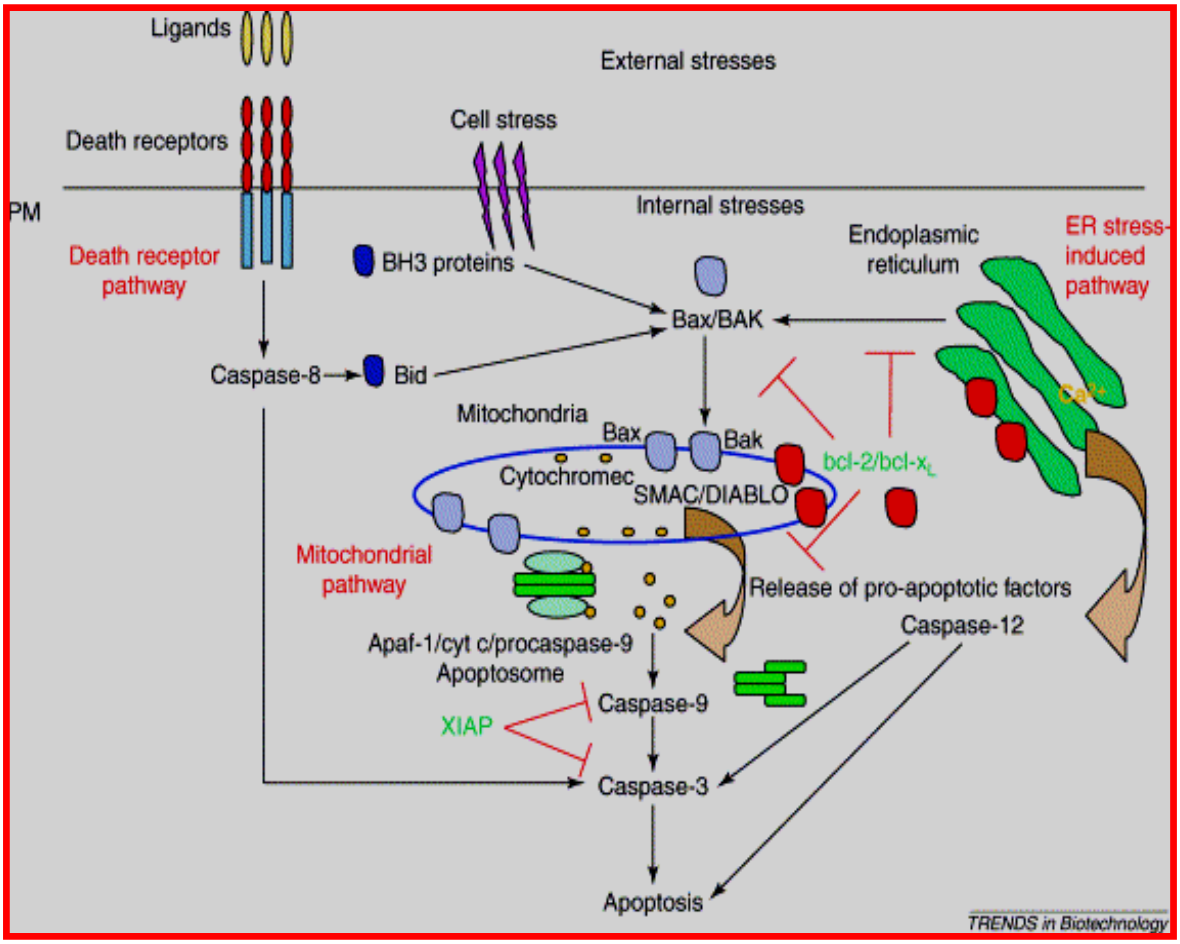


Figura 4: Schema delle principali vie apoptotiche (estrinseca ed intrinseca) e dei fattori proteici implicati nella regolazione dei meccanismi esecutivi del processo, molto spesso alterati nel cancro: in particolare alterazioni nell'espressione delle proteine della famiglia di Bcl-2 e di proteine inibitrici dell'apoptosi quali le IAP sembrano essere responsabili di un aumentata resistenza ai trattamenti chemioterapici nei linfomi. Altri meccanismi di regolazione riguardano il controllo della fuoriuscita di fattori, quali il cit-c e Smac, dai mitocondri.

3.2.1 BCL-2: Il gene BCL-2 codifica una proteina di 26 kD (B-cell lymphoma-2) che inibisce l'induzione dell'apoptosi attraverso la via intrinseca o mitocondriale ed è il membro prototipo di una famiglia di proteine che costituiscono critici 'checkpoint' cellulari nel bilanciamento tra segnali di vita e di morte. La famiglia genica di BCL-2 comprende circa 25 geni, di cui solo sei codificano per proteine antiapoptotiche (Bcl-2,

Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1 e Bcl-B); gli altri geni codificano invece proteine pro-apoptotiche (bax, bak, bok, bad, bik, bim,bid) (Kirkin et al., 2004).

Le proteine della famiglia di Bcl-2 possono essere raggruppate in tre classi diverse e tutte devono possedere almeno un dominio BH (Bcl-2 homology domain): una classe è quella dei fattori di sopravvivenza, un'altra e quella dei fattori di morte, tipo Bax (contenenti domini BH1-BH3) e poi ci sono fattori pro-apoptotici contenenti solo il dominio BH3 (Bid, Bim).

I fattori di sopravvivenza tipo Bcl-2 presentano tre o quattro domini BH; i domini BH1-BH4 mediano interazioni con altri partner proteici e localizzano le proteine stesse in corrispondenza della superficie citoplasmatica di membrane intracellulari come la membrana mitocondriale esterna, il reticolo endoplasmatico e l'involucro nucleare.

I domini BH1-BH3 formano una tasca idrofobica, mentre il dominio amminoterminale BH4 stabilizza questa struttura. La tasca idrofobica può legare le α-eliche BH3 di altri membri pro-apoptotici della famiglia.

Bcl-2 localizza nei mitocondri e previene il rilascio di fattori come il cit-c grazie alla capacità di formare eterodimeri inattivanti con Bax e Bak.

La proteina Bcl-2 è un importante fattore nello sviluppo e nel differenziamento delle cellule B e sembra che cellule 'naive' e della memoria esprimano da 4 a 10 volte più mRNA per Bcl-2 che cellule B dei centri germinativi; i livelli di espressione di Bcl-2 salgono comunque drasticamente nelle cellule B maligne (Shen et al., 2004).

L'over-espressione della proteina Bcl-2 è caratteristica di vari tipi di linfomi e leucemie ed è spesso conseguente al verificarsi della t(14:18) coinvolgente il gene BCL-2 (Fan et al., 2003). Prima di tutto la t(14:18) è stata verificata in pazienti affetti da linfoma follicolare: essa è stata ritrovata in particolare nel 56% dei casi, mentre una over-

espressione di Bcl-2 è comunque riscontrata nel 83% dei casi anche in assenza di riarrangiamenti genetici (Matsumoto et al., 2004).

La t(14:18) non è la sola ritrovata nel linfoma follicolare; infatti varianti citogenetiche giustappongono BCL-2 ai loci immunoglobulinici delle catene leggere IGK o IGL (t(18:22); t(2:18)) (Bentley et al., 2005).

Inoltre la t(14:18) è presente in circa il 34% dei casi di GCB-DLBCL dove è sempre accompagnata da una over-espressione di Bcl-2, mentre è assolutamente assente nel tipo ABC-DLBCL. Bcl-2 può comunque risultare over-espressa anche nel tipo ABC in assenza della tipica t(14:18) a dimostrazione che esistono altri meccanismi a produrre lo stesso risultato per esempio l'attivazione di NF-kB o un più elevato numero di copie del gene BCL-2 **(**Iqbal et al., 2004). Cellule tumorali del tipo GC-DLBCL, mostrano inoltre una maggiore espressione di proteine pro-apoptotiche Bax, Bak, Bad e Bid associate con un più elevato indice di apoptosi spontanea (Bai et al., 2004).

Le proteine della famiglia di Bcl-2 intervengono anche nella tumorigenesi della leucemia linfocitica cronica (LLC): in particolare sono stati riscontrati alti livelli di mRNA di Bcl-2, Bcl-w, Bad, Bak e Bax ed un elevato livello del rapporto Bcl-2/Bax in campioni prelevati da pazienti in vari stadi della malattia; il valore del rapporto Bcl-2/Bax è in relazione alla progressione e influenza la risposta ai trattamenti citotossici; esso viene a ridursi durante l'apoptosi spontanea ed indotta dai chemioterapici; un elevato rapporto Bcl-2/Bax è quindi correlato con una sfavorevole prognosi (Sanz et al., 2004; Schattner, 2002). Elevati livelli di espressione di Bcl2 e BclX e più bassi livelli di Bax e Bak sono stati inoltre riscontrati in casi di linfoma mantellare (MCL) (Rummel et al., 2004).

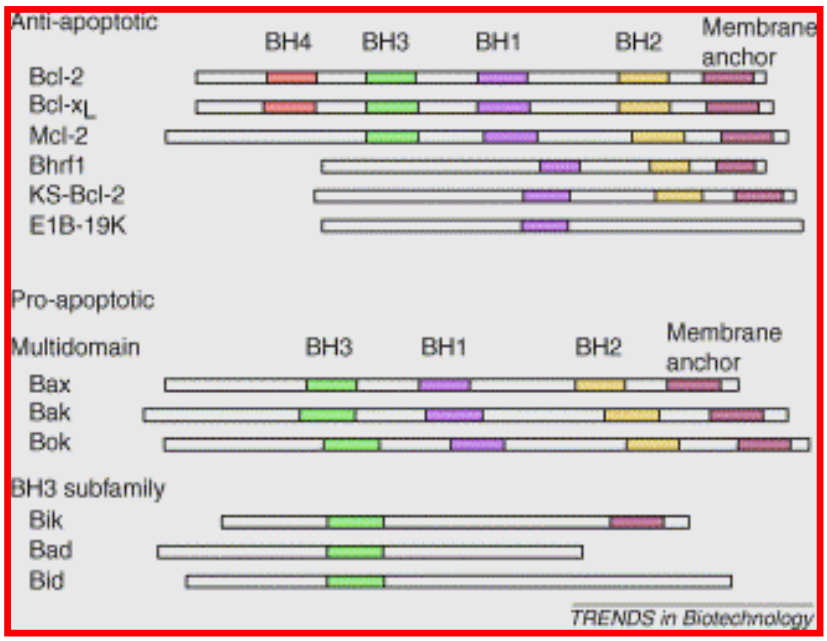


Figura 5: Proteine della famiglia di Bcl-2: caratteristica distintiva delle proteine della famiglia è la presenza di almeno un dominio BH (Bcl-2 homology domain); si distinguono fattori anti-apoptotici, pro-apoptotici e proteine pro-apoptotiche contenenti solo il dominio BH3: l'equilibrio tra fattori di vita e fattori di morte influenza il destino di una cellula e aumentati livelli del rapporto Bcl-2/Bax conferiscono resistenza all'apoptosi in vari tipi di cancro

Vari tentativi per mettere a punto nuove strategie di cura nelle leucemie e nei linfomi hanno l'obiettivo di superare gli effetti citoprotettivi di Bcl-2.

Per esempio è possibile utilizzare con buoni risultati farmaci che down-regolano l'espressione di Bcl-2 come retinoidi sintetici o inibitori dell'istone-deacetilasi; oligonucleotidi antisenso sono stati somministrati clinicamente e buoni risultati sono stati ottenuti nei LNH refrattari alla chemioterapia e in casi di LLC (Webb et al.,1997); ancora sono state utilizzate piccole molecole inibitrici che legano la tasca idrofobica di Bcl-2, come il Gossypol, un composto trovato nei semi di cotone, originariamente in

uso nella medicina cinese; le prove cliniche hanno però dimostrato una certa tossicità e sfavorevoli proprietà farmacologiche per questa molecola **(**Reed and Pellecchia, 2005**).**

3.2.2 IAPs : nell'uomo sono prodotte circa otto proteine della famiglia delle IAP (inhibitor of apoptosis protein): c-IAP1, c-IAP2, NAIP, Survivin, XIAP, Bruce, ILP-2, and Livin; tali proteine sono caratterizzate dalla presenza nella loro porzione amminoterminale di una o più ripetizioni di un dominio altamente conservato di 70 amminoacidi detto BIR (baculovirus IAP repeat); inoltre, nell'uomo, tutte le IAP, tranne NAIP e Survivina presentano una sequenza conservata carbossiterminale denominata RING (Really Interesting New Gene) (Schimmer, 2004).

Come indicato dal loro nome le IAP sono in grado di bloccare l'apoptosi; tali proteine possono agire con vari meccanismi, primo fra tutti quello di inibire direttamente le caspasi. In particolare, le proteine XIAP, cIAP1, cIAP2 e Survivina si legano direttamente alle caspasi 3, 7 e 9 inibendole (Shiozaki et al.,2004).

X-IAP è la proteina più studiata e quindi meglio conosciuta ma anche quella con la più potente attività inibitoria (Holcik et al., 2001); essa presenta tre domini BIR non equivalenti: il dominio BIR2 ed alcuni amminoacidi tra BIR1 e BIR2 sono essenziali per l'inibizione delle caspasi 3 e 7 (Suzuki et al., J. Biol. Chem 2001), mentre il dominio BIR3 da solo inibisce la caspasi 9.

Il dominio RING è stato identificato invece come caratteristico di varie proteine che legano ubiquitina del tipo E3. Così XIAP (ma anche cIAP1) può portare a termine un'auto-ubiquitinazione che marca per la degradazione proteosomica: con questo meccanismo le IAP possono regolare negativamente la loro attività. Le IAP possono però marcare per la degradazione anche altri substrati: XIAP, in particolare, marca per

la degradazione la caspasi-3 attiva (Suzuki et al., PNAS 2001) e sembra avere un'attività ubiquitin-ligasica anche su Smac (ciò promuove una rapida degradazione di tale fattore una volta rilasciato dai mitocondri) (MacFarlane et al., 2002)

Un altro importante meccanismo regolatorio delle IAPs agisce a livello della trascrizione: per esempio un diverso profilo di espressione per Livina, XIAP e Survivina si verificano durante l'attivazione dei linfociti; in particolare l'espressione della survivina varia nelle diverse fasi del ciclo cellulare, mentre l'espressione della livina e di XIAP è correlata con la moltiplicazione cellulare: i diversi membri di questa famiglia sembrano dunque avere funzioni uniche piuttosto che ridondanti (Nachmias et al., 2004). Ricordiamo che la trascrizione di XIAP, cIAP1 e cIAP2 è sotto il controllo di NF-kB (Hong et al., 2000).

Una caratteristica unica dell'mRNA di XIAP è quella di presentare una regione non trascritta in 5'che contiene speciali sequenze dette IRES (internal ribosomal entry site): la traduzione mediata da sequenze IRES è stata per la prima volta descritta per gli mRNA virali e serve ad iniziare la traduzione proteica indipendentemente dalla presenza di un cappuccio in 5' di 7-metil-guanina. Le sequenze di mRNA contenenti IRES sono in particolare tradotte durante condizioni di stress come infezioni virali, deprivazione di fattori di crescita, ipossia e svolgono un ruolo critico perché possano essere mantenute le funzioni di XIAP in simili condizioni sfavorevoli; considerato che queste condizioni sono spesso riscontrate nei tessuti neoplastici, la traduzione mediata da IRES può contribuire alla progressione tumorale (Holčík et al., 2003).

Quando le IAP si associano alle caspasi, inibendole, tale interazione fornisce un ulteriore meccanismo regolatorio intrinseco e cioè le caspasi a lovo volta possono scindere le IAP: in particolare ciò è noto per XIAP, cIAP1 e Livina, proteine su cui

agiscono solo le caspasi effettrici come la caspasi 3 e 7 ma non la caspasi 9. Dalla scissione di XIAP prendono origine due frammenti: uno amminoterminale, contenente i domini BIR1 e BIR2, con ridotte funzioni inibitorie sulle caspasi 3 e 7; ed uno carbossiterminale contenente i domini BIR3 e RING e che mantiene la stessa attività inibitoria sulla caspasi 9 (Deveraux et al., 1999). La scissione proteolitica di cIAP1 si verifica subito dopo il dominio BIR3 e dà origine ad un frammento contenente solo il dominio RING con attività pro-apoptotica (Clem et al., 2001); ancora la Livina è scissa

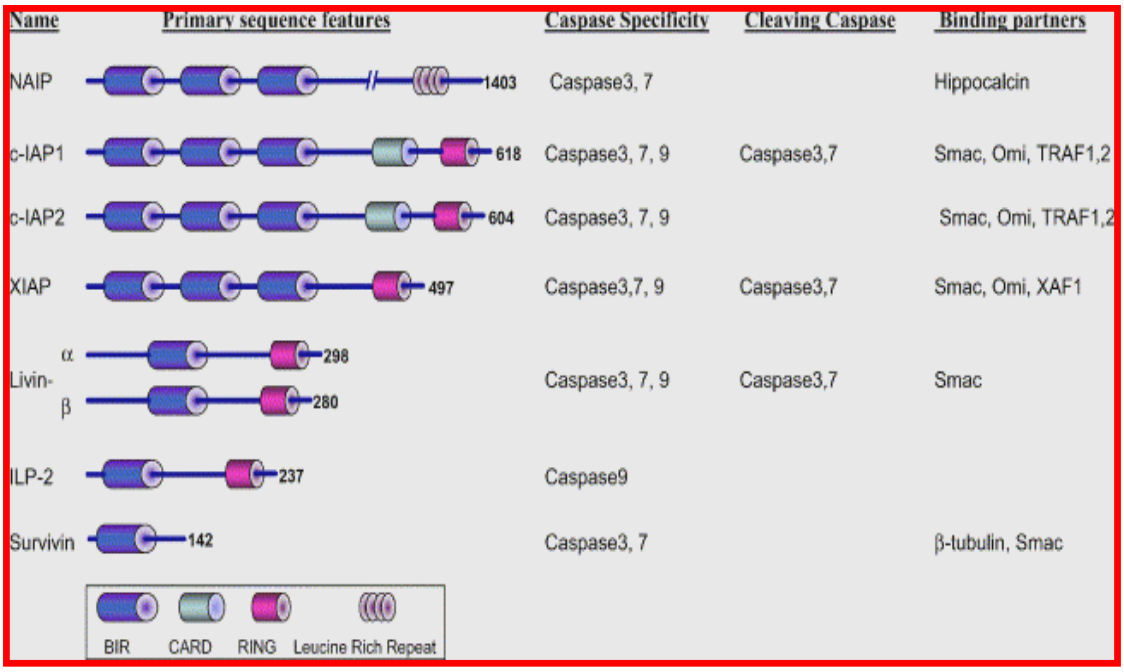


Figura 6: Proteine della famiglia delle IAP (inhibitor of apoptosis protein): nello schema è possibile distinguere i domini proteici caratteristici della sequenza primaria dei vari membri di questa famiglia, e sono inoltre indicati le caspasi che ogni membro è in grado di colpire ed i fattori proteici come Smac che competono con le caspasi per il legame alle IAP stesse.

per dare origine ad un frammento pro-apoptotico contenente sia il dominio RING sia domini BIR (Nachmias et al., 2003)..

E'stato recentemente dimostrato che anche la fosforilazione può intervenire come un meccanismo regolatorio delle IAP: in particolare la proteina Akt può interagire con XIAP, fosforilandola ed aumentandone la stabilità (Dan et al., 2004). Le IAP sono così coinvolte in diverse vie di trasduzione del segnale: cIAP1 e cIAP2 interagiscono con i TRAFs all'interno dei complessi di segnalazione sulla coda citoplasmatica dei recettori TNF e inibiscono la conseguente apoptosi; ancora l'attivazione della via di JNK1 è richiesta per la soppressione dell'apoptosi da parte di XIAP, NAIP e livina e la via della PI3K/Akt è richiesta per la sopravvivenza mediata da XIAP (De Graaf et al., 2004): è possibile quindi che si instaurino dei meccanismi di feedback positivo in cui le IAP attivano vie di segnalazione che a loro volta portano all'attivazione delle IAP stesse (Hofer-Warbinek et al., 2000).

Ma il principale meccanismo su cui si basa la regolazione delle IAP è il rilascio da parte dei mitocondri di fattori come Omi/Htra2, XAF-1 e Smac/Diablo.

Smac è prodotta come un precursore proteico di 29 kDa, contenente una sequenza segnale N-terminale che viene rimossa quando la proteina raggiunge la sua locazione finale nei mitocondri (Verhagen and Vaux, 2002). La forma matura della proteina (23 kDa) viene rilasciata con meccanismi ancora poco chiari in seguito a stimoli apoptogeni a volte contemporaneamente, a volte separatamente al cit c.

Studi fatti con fibroblasti embrionali murini suggeriscono una diversa regolazione per il rilascio di Smac e del cit c dai mitocondri dopo stimolazione con TRAIL: infatti mentre il rilascio del cit c si verifica sia in amimali Bid $^{-/-}$, Bax $^{-/-}$ e Bak $^{-/-}$, ma non in doppi knockout Bax $^{-/-}$ Bak $^{-/-}$, il rilascio di Smac è bloccato in tutti questi casi.

E’ stato ipotizzato che tBid è direttamente coinvolto nel rilascio del cit c dai mitocondri intervenendo nella traslocazione di Bax e che in assenza di Bax, tBid può indurre la traslocazione di Bak; la fuoriuscita del cit c in assenza di tBid si spiega invece considerando che anche stimoli diversi da Bid possono attivare sia Bax che Bak; al contrario è stato proposto che il rilascio di Smac è assolutamente dipendente da tBid mentre Bax e Bak non sono mutuamente esclusivi nel controllare il rilascio di tale fattore (Kandasami et al., 2003).

Smac agisce come un dimero e contribuisce all’attivazione delle caspasi sequestrando le IAP. Il legame di Smac alle IAP richiede la presenza di una sequenza particolare di quattro amminoacidi (Ala-Thr-Pro-Ile) della regione N-terminale di ogni singolo monomero; tale sequenza riconosce, per esempio, una tasca idrofobica nel dominio BIR3 di XIAP; un simile dominio di interazione è presente nella piccola subunità (p12) che costituisce la caspasi 9 (Ala-Thr-Pro-Phe) ed è proprio questo il meccanismo, e cioè una semplice competizione, quello con cui Smac impedisce che la caspasi 9 leghi il dominio BIR3 di XIAP. La stessa sequenza N-terminale di Smac può legare anche il dominio BIR2 di XIAP competendo con la subunità p10 della caspasi 3 processata: essendo dimerica Smac può potenzialmente inibire due domini BIR contemporaneamente (Fesik and Shi, 2001).

Alterazioni nell’espressione delle IAP sono state osservate in vari tipi di cancro: ciò può essere messo in relazione alla recente osservazione che in varie linee tumorali umane cambiamenti genetici e molecolari associati alla trasformazione maligna portano all’innesco di cascate apoptotiche che risultano costitutivamente attive (ad esempio le caspasi 8 e 3) (Yang et al., 2003).

Alterazioni dell'espressione delle IAP sono state osservate in leucemie e linfomi. In particolare l'espressione della survivina è correlata con una cattiva prognosi nel DLBCL (Adida et al, 2000), nel linfoma mantellare (Martinez et al., 2004) nelle leucemie acute (Wrzesieň-Kuś et al., 2004) e croniche sia linfocitiche che mieloidi (Schliep et al., 2004; Tamm et al., 2000). Alti livelli di XIAP sono stati trovati in cellule primarie di HD (Kashkar et al., 2003) e ci sono evidenze per un diretto coinvolgimento di cIAP2 nella linfomagenesi del linfoma MALT poichè in molti casi di questo tumore si osserva la t(11:18) che produce una fusione tra i loci di cIAP2 e di MLT; come già sottolineato, la risultante proteina di fusione cIAP2/MALT1 coopera con Bcl-10 nell'oncogenesi incrementando l'attivazione del fattore trascrizionale NF-kB (Liu et al., 2001).

Considerato il ruolo svolto dalle IAP nel cancro e nella resistenza ai trattamenti chemioterapici queste proteine costituiscono un bersaglio molto promettente per la cura dei tumori e diverse strategie sono attualmente oggetto di studio.

Oligonucleotidi antisenso contro XIAP inducono in apoptosi e sensibilizzano ai trattamenti chemioterapici blasti di leucemia mieloide acuta; simili approcci sono stati messi in atto con la survivina, con induzione di apoptosi in varie linee cellulari di leucemia e linfoma e in modelli di trapianti tumorali murini. Altri approcci per colpire l'overespressione della survivina sono stati fatti mediante siRNA e stimolando la risposta immune verso il tumore da parte di linfociti T citotossici mediante cellule dendritiche presentanti peptidi derivati dalla survivina stessa (Rohayem et al., 2000; Andersen et al, 2000; Andersen et al., 2001).

Altre strategie messe in atto si basano sull'overespressione di Smac (Hunter et al., 2003) o sull'uso di peptidi derivati da Smac che è stato visto sensibilizzano alla chemioterapia e ai trattamenti vari tipi di cancro in vitro e in modelli animali. Inoltre sono stati portati

a termine screening biochimici che hanno condotto all'identificazione di nuove molecole non peptidiche che hanno l'abilità di distruggere l'interazione tra XIAP e la caspasi 3 (Wu et al., 2003); tra questi i derivati della fenilurea sembrano essere molto promettenti poiché sensibilizzano alla chemioterapia vari tipi di tumori e leucemie (Schimmer et al., 2004).

STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo si produce nelle cellule a seguito di alterazioni nell'equilibrio redox dovute o ad iperproduzione di radicali liberi o ad una inefficienza dei sistemi antiossidanti. E' noto che, quando vengono generati ad alte concentrazioni i radicali liberi, i radicali derivati e le specie reattive non radicaliche sono tossiche per la cellula e possono indurre apoptosi. A concentrazioni moderate però specie reattive quali il radicale dell'ossido nitrico ($N0^{\cdot}$), l'anione superossido od altre specie reattive dell'ossigeno svolgono un ruolo importante come mediatori di effetti biologici in vari fenomeni fisiologici: nella regolazione del tono vascolare; nel monitoraggio della tensione di ossigeno per il controllo della ventilazione e della produzione di eritropoietina; nella trasduzione di segnali da parte di recettori di membrana; nella regolazione dell'espressione genica.

Così, quando regolano un processo fisiologico, i radicali liberi sono prodotti in maniera controllata da sistemi enzimatici cellulari e grazie ad un fine bilanciamento dell'omeostasi redox. Disfunzioni nei meccanismi che controllano la produzione di radicali causano quello stress ossidativo cronico caratteristico di vari stati patologici

come il diabete, l'aterosclerosi, i processi neurodegenerativi, l'artrite reumatoide, la senescenza ed il cancro (Dröge, 2002).

4. Sistemi enzimatici che generano radicali liberi

Esistono vari tipi di radicali liberi e di loro derivati e in particolare si possono considerare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le specie reattive dell'azoto (RNS).
L'anione superossido si forma per riduzione univalente dell'ossigeno molecolare; questo processo è mediato da enzimi come NAD(P)H-ossidasi e xantina ossidasi o dal semi-ubichinone della catena di trasporto degli elettroni.
La NADPH-ossidasi è utilizzata dai macrofagi e dai neutrofili attivati per produrre grandi quantità di anione superossido e di conseguenza di altri ROS ad azione microbicida durante il così detto 'oxidative burst', ma una produzione di ROS per questa via è stata documentata in altri sistemi cellulari come fibroblasti e cellule epiteliali. La NAD(P)H-ossidasi è un complesso proteico contentenente heme; è composto da proteine legate alla membrana, formanti il citocromo b_{588} (gp 91^{phox} e $p22^{phox}$ presenti nei fagociti ed altri omologhi di altri tessuti), dalle proteine citosoliche p67 e p47 e da GTP-asi come rac1 e rac2 (Bokoch and Knaus, 2003). Tale complesso può attivarsi attraverso stimolazione recettoriale per esempio mediante il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) ma anche attraverso il NGF o il PDGF con conseguente produzione di ROS.
La xantina ossidasi invece produce anione superossido convertendo la ipoxantina in xantina e quest'ultima in acido urico; una produzione di ROS attraverso xantina ossidasi

è stata per esempio osservata in cellule endoteliali dopo stimolazione con il fattore di necrosi tumorale TNF.

La superossido-dismutasi converte l'anione superossido in perossido di idrogeno anche se lo stesso anione può essere trasformato non enzimaticamente sempre ad H_2O_2 e ossigeno singoletto. In presenza di metalli di transizione, come ioni rame e ioni ferrosi, l'acqua ossigenata è convertita nel radicale idrossilico ($OH^{\cdot}$) molto reattivo; ancora il perossido di idrogeno può essere convertito ad acqua dalla catalasi o dalla glutatione perossidasi. L'anione superossido e l'ossido d'azoto NO possono essere trasformati enzimaticamente o non enzimaticamente in specie reattive non radicaliche come l'ossigeno singoletto o il perossido d'idrogeno o in perossinitrito (ONOO-).

L'enzima NOS produce il radicale $NO^{\cdot}$ utilizzando come substrato L-arginina; il radicale NO può essere convertito ad altre RNS come il catione NO^{+}, l'anione NO^{-} o il perossinitrito

Una produzione regolata di radicali liberi negli organismi superiori si verifica infine mediante importanti sistemi enzimatici quali quelli delle ciclossigenasi e delle lipossigenasi. In particolare la isoforma 5-LOX rappresenta una fonte inducibile di ROS nei linfociti; per esempio la 5-LOX è coinvolta nella produzione di perossidi in risposta alla stimolazione del recettore CD28 (Los et al., 1995).

4.1 Trasduzione del segnale e regolazione dell'espressione genica ROS mediata

Incrementi dello stato redox cellulare e delle specie radicaliche prodotte mediante i sistemi enzimatici suddetti agiscono nelle cellule attivando vie di trasduzione del segnale e regolando l'attività di diversi fattori trascrizionali: sebbene non è esattamente

noto il meccanismo con cui agiscono i radicali, sicuramente è importante la loro interazione con i residui di cisteina delle proteine bersaglio (Finkel, 2000); lo zolfo presente in questi residui di cisteina può essere ossidato formando legami disulfidici (-SSR) o acido sulfenico (-SOH); da questi cambiamenti nei gruppi SH- conseguono modificazioni conformazionali che in funzione della proteina bersaglio possono causare un rafforzamento o un indebolimento del legame al DNA, il rilascio di subunità regolatorie, o possono promuovere la formazione di complessi che sono necessari perché la trasduzione del segnale o la trascrizione procedano.

E' noto, per esempio, che il perossido di idrogeno può causare la fosforilazione e quindi l'attivazione di parecchie protein-chinasi come STAT3, JNK, p38 e Akt (Hensley et al., 2000); in questi casi l'H_2O_2 verrebbe a causare una inattivazione ossidativa di protein tirosin fosfatasi (PTP) (Lee and Esselman, 2002); le PTP presentano nel loro sito attivo un motivo CX_5R nel quale un residuo di cisteina è determinante per l'attività catalitica; l'inattivazione delle PTP può verificarsi con due diversi meccanismi: la cisteina al sito attivo può essere convertita in cistein-acido sulfenico (Cys-SOH) o alternativamente dal glutatione in forma disulfidica (GS-SG) in un legame disulfidico misto (Cys-SG). A seguito dell'inattivazione di protein tirosin fosfatasi numerosi autori hanno riscontrato un incremento massiccio anche della fosforilazione in tirosine di protein tirosin-chinasi come Lck, Fyn, Syk e ZAP70; anche in questi casi non è noto il preciso meccanismo con cui medie condizioni ossidanti attivino le varie proteine della famiglia src (Nakashima et al., 2005). E' anche dall'attivazione di tirosin chinasi che sembra dipendere la modulazione di vie di traduzione del segnale più a valle come quella di Ras/Raf/ERK e delle SAPK(Allen and Tresini, 2000). In particolare il perossido d'idrogeno stimola la formazione dei complessi SHC-Grb2-SOS che attivano Ras-GDP

a Ras-GTP (Rao,1996). Atri esempi di vie di traduzione del segnale la cui attivazione è regolata dai ROS sono quelle delle protein-chinasi C (Gopalakrishna and Jaken, 2000).
Vari fattori trascrizionali sono sensibili all'ambiente redox, per esempio AP-1, NF-kB p53 : in questi casi residui di cisteina critici, che ossidandosi possono alterare la conformazione del fattore trascrizionale, si trovano nelle regioni DBD (DNA binding domain) di interazione con il DNA. La formazione di ponti disolfuro può compromettere la dimerizzazione del fattore trascrizionale o ancora possono risultare alterate le interazioni proteina-proteina con ligandi coattivatori o nella costituzione dei complessi di trascrizione.
NF-kB è sottoposto ad una duplice regolazione redox nel citosol e nel nucleo: le alterazioni nella conformazione di NF-kB facilitano il rilascio di questo fattore da parte di IKB; d'altra parte nel nucleo NF-kB può legarsi al DNA solo se non risultano ossidate particolari cisteine dei DBD; quindi nel nucleo residui tiolici di NF-kB vengono ridotti da enzimi come la tireodoxina e la glutaredoxina (Flohè et al., 1997).

4.2 ROS e cancro

E' già stato sottolineato che tra i molteplici stati patologici caratterizzati da disfunzioni dei sistemi che regolano l'omeostasi redox c'è anche il cancro e vari tipi di tumore sono associati a livelli ossidativi più alti (Toyokuni et al.,1995): per esempio è stato visto che cellule derivanti da diversi tipi di carcinomi umani (al seno, ai polmoni, al fegato, al rene) contengono elevati livelli di 8-idrossi-2'-deossiguanosina e che cellule di carcinoma al colon-retto hanno hanno uno stato ossidativo più elevato rispetto alle corrispondenti cellule epiteliali non tumorali (Kondo et al, 1999).

I ROS sono dei potenti carcinogeni poiché facilitano la mutagenesi, la promozione e la progressione tumorale; essi stimolano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare attraverso l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale e dei fattori trascrizionali sopra descritti e possono determinare una resistenza del tumore ai trattamenti chemioterapici (Benhar et al., 2002). Se da una parte, infatti, lo stress ossidativo basale più alto può innescare l'apoptosi in cellule immortalizzate o in cellule nei primi stadi della trasformazione maligna, d'altra parte l'azione prolungata dei ROS può causare una successiva progressione tumorale e l'acquisizione di nuovi meccanismi di resistenza alla morte cellulare.

Le cellule neoplastiche possono produrre ROS con vari meccanismi per esempio come conseguenza di un cattivo funzionamento della superossido dismutasi. E' stato infatti riscontrato che in linee cellulari tumorali, coltivate in vitro, la over-espressione della SOD produce differenziamento cellulare, diminuzione della crescita e della proliferazione causando una inversione del fenotipo maligno verso quello non maligno. Numerosi lavori mostrano però che nei tumori in vivo la situazione è differente e che la SOD è altamente espressa nei tumori solidi aggressivi, sempre associata ad una cattiva prognosi e ad una resistenza ai trattamenti citotossici (Kinnula and Crapo, 2004).

Molti geni associati al fenotipo tumorale comportano la produzione di elevate quantità di ROS tra questi il gene RAS, mutato in molti tumori; alla iper-attivazione della proteina ras è associata una copiosa produzione di anione superossido; in particolare la produzione di anione superossido in cui interviene ras si verifica attraverso rac che attiva i complessi di membrana della NAD(P)H ossidasi (Pennini, 1997). Fibroblasti e cheratinociti transfettati con l'oncogene ras incrementano enormemente la produzione di anione superossido che media effetti mitogenici e di proliferazione cellulare (Irani et

al., 1997). Mutazioni nel gene RAS sono state trovate, per esempio, nel 95% dei casi di cancro al pancreas e proprio in cellule di adenocarcinoma pancreatico MIA PaCa-2 e PANC-1 sono molto alti i livelli di ROS; questi ultimi sono generati mediante fattori di crescita che stimolano il complesso della NAD(P)H, e inducono sopravvivenza cellulare e inibizione dell'apoptosi (Vaquero et al., 2004); anche in questo caso l'over-espressione della MnSOD viene a determinare una inibizione della crescita e a causare induzione di apoptosi (Cullen et al., 2003).

In altri sistemi cellulari l'attività della NAD(P)H ossidasi nel generare i ROS dopo stimolazione recettoriale ad opera di fattori di crescita o citochine può essere sostituita da altri sistemi enzimatici. In paticolare è stato visto che l'attivazione di NF-kB mediante interleuchina-1β prevede la produzione di specie reattive dell'ossigeno che sono prodotte in maniera differente in cellule tumorali derivate da monociti o da linfociti: in particolare nella linea cellulare U937 è richiesta la NAD(P)H ossidasi, mentre nelle cellule linfoidi sembra essere indispensabile la 5-lipossigenasi (Bonizzi et al.,1999).

LE LIPOSSIGENASI

Le lipossigenasi (LOX o LO) costituiscono una famiglia eterogenea di enzimi in grado di perossidare i lipidi e di causare l'ossigenazione di acidi grassi polinsaturi trasformandoli nei corrispondenti derivati idroperossidi.

Il substrato principe su cui agiscono le LOX è l'acido arachidonico (AA) liberato dalle membrane cellulari ad opera della fosfolipasi A_2; l'AA, un acido grasso polinsaturo a 20 atomi di carbonio (20:4($\Delta_{5,8,11,14}$)), nelle cellule è esterificato ai fosfolipidi in

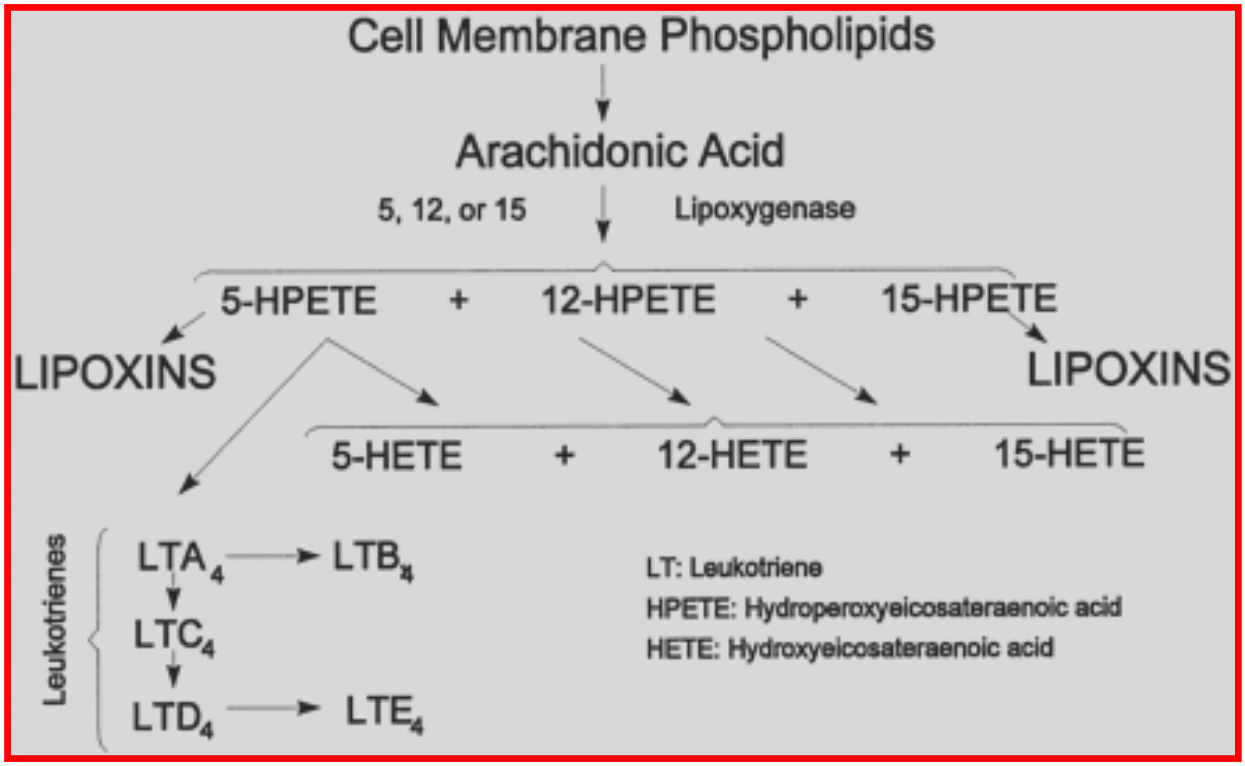
posizione 2. L'ossigenazione dell'acido arachidonico ad opera delle diverse isoforme di lipossigenasi è stereospecifica: in base alla posizione in cui è addizionato l'ossigeno possiamo distinguere la 5-LOX (Rådmark, 2002), la 12-LOX (Yoshimoto and Takahashi, 2002) e la 15-LOX (Kuhn et al., 2002) insieme ad altre isoforme.

Le LOX sono delle ossigenasi che contengono al loro sito attivo un atomo di ferro all'interno di un gruppo non heme; perché l'enzima sia funzionante l'atomo di ferro al sito attivo si deve trovare nella forma ossidata (Fe3+): per questo le LOX, durante il loro ciclo catalitico, producono perossidi riducendosi (Fe2+) e sfruttano perossidi per ritornare nello stato attivo (Fig.7 b).

Un primo stadio di ossidazione dell'acido arachidonico accomuna le varie LOX e porta alla formazione degli acidi idroperossieicosatetraenoici (5-HPETE, 12-HPETE, 15-HPETE) che possono essere successivamente ridotti dalla glutatione perossidasi a formare i corrispondenti acidi idrossieicosatetraenoici HETE (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE); solo la 5-LOX catalizza, successivamente all'ossigenazione del AA a 5-HPETE, una reazione di deidratazione di quest'ultimo composto con formazione di un epossido corrispondente al leucotriene A_4 (LTA_4); l'idrolisi del LTA_4 ad opera della leucotriene A_4 idrolasi porta alla formazione di un altro importante prodotto della 5-LOX e cioè il LTB_4; dal LTA_4 inoltre, grazie all'intervento di altri sistemi enzimatici, prendono origine gli altri leucotrieni (LTC_4, LTD_4, LTE_4) (Fig.7 a).

Una particolarità della 5-LOX è che questo enzima necessita per la propria attivazione di tutta una serie di condizioni che vanno dalla richiesta di ATP ad un incremento di Ca^{++} intracellulare; inoltre per l'attività catalitica della 5-LOX è necessaria la presenza della proteina FLAP (5-lipoxygenase-activating protein).

(a)



(b)

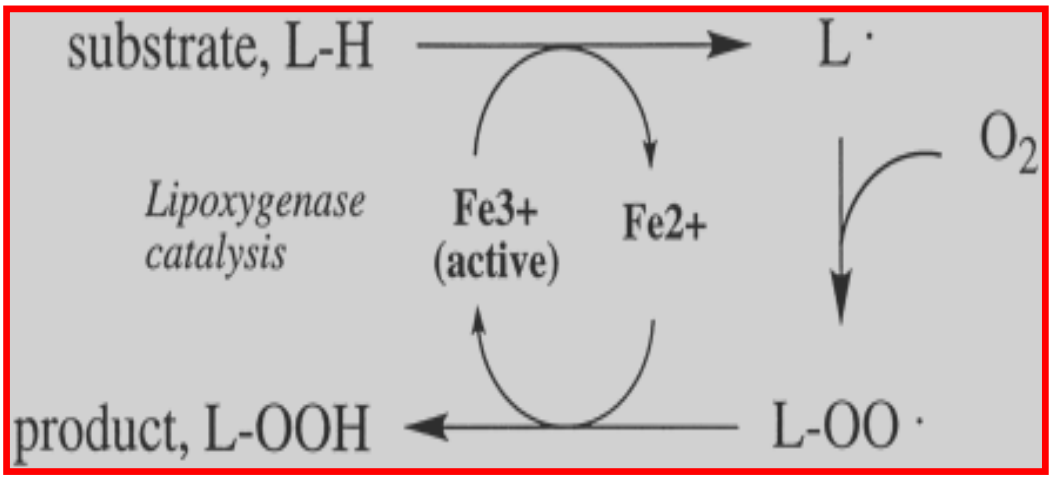


Figura 7: (a) Principali vie biosintetiche di conversione dell'acido arachidonico liberato dalle membrane ad opera delle lipossigenasi con formazione dei metaboliti HPETE, HETE e di leucotrieni. (b) Ciclo catalitico dello ione Ferro al sito attivo delle lipossigenasi.

L'attivazione delle vie biosintetiche che portano alla produzione di leucotrieni richiede quindi un incremento del calcio intracellulare che, insieme ad eventi fosforilativi, viene a causare la traslocazione della 5-LOX dal citosol all'involucro nucleare dove è presente FLAP; quest'ultima trasferisce l'AA liberato dalla PLA_2 alla 5-LOX permettendo una trasformazione più efficace del substrato (Ford-Hutchinson et al., 1994) (Fig.8).

5. 5-Lipossigenasi e linfociti B

Sono stati prodotti numerosi studi che mettono in evidenza l'importanza della isoforma 5-LOX nelle cellule B: per esempio linee cellulari di linfoma di Burkitt sono in grado di convertire l'AA nei metaboliti 5-HETE e LTB4, attività che risulta particolarmente significativa in linee cellulari EBV positive (Jakobsson et al., 1991).

Altri studi evidenziano l'espressione della 5-LOX e di FLAP, mediante RT-PCR, in particolare in cellule B tonsillari o in linee cellulari EBV+ come le BL41-E95-A; l'enzima sembra espresso anche in leucociti polimorfonucleati, ma non in linee cellulari linfoblastoidi di origine T (MOLT3, MOLT4, Jurkatt) o in linee cellulari di derivazione monocitica come le U937. L'espressione della 5-LOX nella linea cellulare BL41-E95-A è stata confermata anche attraverso Western Blotting (Jakobsson et al., 1992), mentre studi di immunoistochimica dimostrano che la 5-LOX è principalmente localizzata nei nuclei delle cellule B dove viene a svolgere la sua funzione (Jakobsson et al.,1995).

Nelle cellule B l'attività della 5-LOX sembra essere criptica e solo dopo una opportuna stimolazione l'enzima si attiva in maniera significativa. Gli stimoli che comportano l'attivazione della 5-LOX possono essere diversi tra di loro; un significativo effetto è

stato per esempio dimostrato da agenti che comportano una deplezione di glutatione (diammide); in tali casi sembra essere più importante l'influenza che questi composti hanno sullo stato redox cellulare piuttosto che la deplezione di glutatione in se stessa; infatti l'inibitore della γ-glutammil-cistein-sintasi BSO (buthionine sulfoximine) non è in grado di stimolare l'attività della 5-LOX.

L'attivita della 5-LOX nelle stessa linea BL41-E95-A, risulta inoltre fortemente incrementata da condizioni di assenza di siero; la stessa azione inibitoria del siero sull'attività della 5-LOX è svolta dal selenio. Selenoenzimi con attività glutatione-perossidasica diretta contro gli idroperossidi dei fosfolipidi inibiscono quindi l'attività della 5-LOX in linfociti B, mantenendola criptica, in particolare a seguito della rimozione degli idroperossidi indispensabili per la conversione dell'atomo di ferro al sito catalitico della 5-LOX dalla forma ferrosa inattiva alla forma ferrica attiva (Werz and Steinhilber, 1996).

Il ruolo svolto dalle specie reattive dell'ossigeno nella regolazione dell'attivita della 5-LOX in cellule B è stato inoltre dimostrato da esperimenti in cui sia il perossido di idrogeno e altri idroperossidi sia ROS rilasciati da granulociti erano in grado di attivare l'enzima: quindi anche se l'attività catalitica della 5-LOX, in linee cellulari in vitro, sembra essere bassa non si può escludere che simili meccanismi di stimolazione enzimatica agiscano in vivo in presenza di altre componenti cellulari (Werz et al., 2000).

E' stato anche dimostrato che stimoli diversi dall'ossidazione, come lo shock osmotico dovuto a sorbitolo o cloruro di sodio, inibitori di protein-tirosin-fosfatasi e citochine infiammatorie come il TNFα e IL-1 incrementano l'attività della 5-LOX indotta dallo ionoforo A23187 sulla linea cellulare BL41-E95-A.

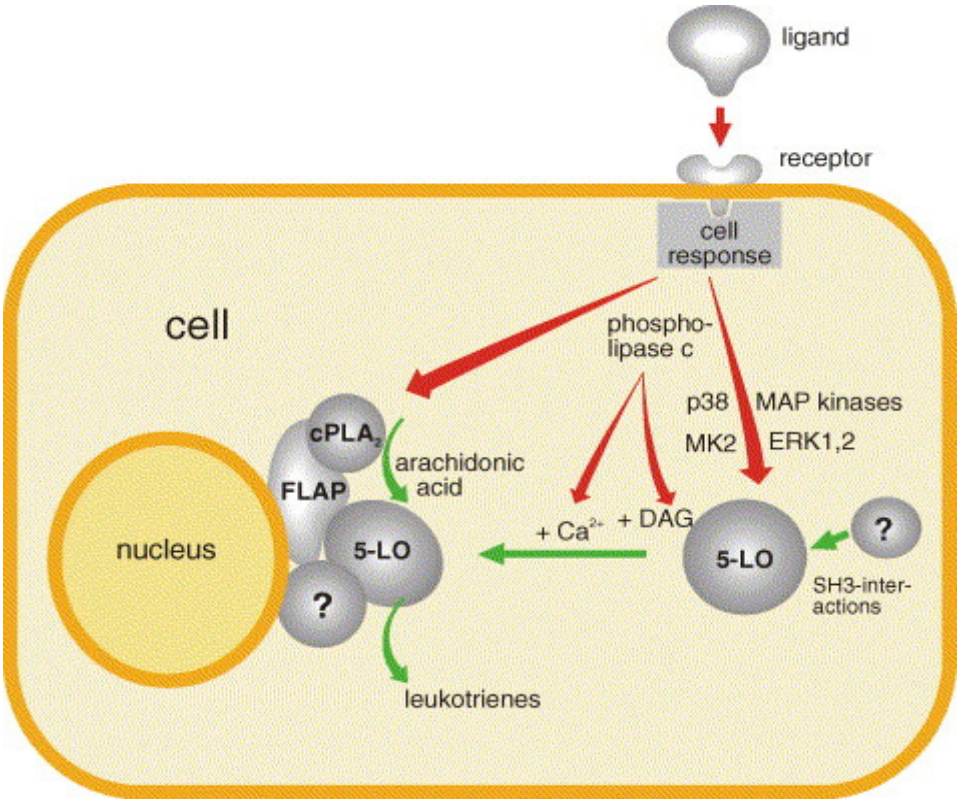


Figura 8: La figura illustra i vari eventi che determinano l'attivazione della 5-LOX: stimolazioni recettoriali possono causare un incremento del calcio intracellulare o attivare le vie delle MAPK che fosforilano l'enzima presente nel citosol. Le diverse MAPK possono attivare la LOX conseguentemente agli effetti di eventi stressanti le cellule; non è inoltre escluso che l'attivazione enzimatica possa verificarsi mediante la diretta interazione della 5-LOX con proteine regolatorie contenenti domini SH3. Il calcio e gli eventi fosforilativi comportano la traslocazione della 5-LOX all'involucro nucleare, dove l'interazione con FLAP facilita il trasferimento del substrato AA, liberato dalla PLA2 citosolica, all'enzima che può quindi svolgere la propria azione catalitica con estrema efficienza.

Questi stimoli provocano l'attivazione della p38 MAPK e l'attivazione di protein chinasi più a valle MK che fosforilano la 5-LOX regolandone l'attività: quindi agenti ossidanti possono incrementare l'attività della 5-LOX in una duplice maniera : promuovendo la formazione, al sito catalitico dell'enzima, della forma ferrica ma anche promuovendo la fosforilazione della 5-LOX conseguente all'inattivazione di PTP (Werz et al., 2001).

In particolare la chinasi MK2, attivata dalla p38 MAPK, verrebbe a causare la fosforilazione della Ser-271 della 5-LOX, un evento fortemente stimolato dalla liberazione dalle membrane di acido arachidonico (Werz et al., The Journal of Biological Chemistry 2002). E' stato altresì proposto, da studi sui leucociti polimorfonucleati, che la stimolazione della 5-LOX attraverso eventi di stress e l'attivazione della p38 MAPK è un evento indipendente dalla stimolazione enzimatica operata dal Ca^{++}; infatti l'attivazione della p38 MAPK può verificarsi anche in presenza di sostanze che depletano lo ione calcio e con un'efficienza paragonabile (Werz et al., Blood 2002).

L'importanza degli eventi fosforilativi e del AA nella regolazione dell'attività della 5-LOX dei leucociti è stata inoltre dimostrata dal ruolo svolto dalle chinasi ERK che vanno a fosforilare in particolare la Ser-663 dell'enzima, un evento che può verificarsi contemporaneamente alla stimolazione operata dalla p38 MAPK(Werz O. et al., The FASEB Journal, 2002). Altri eventi fosforilativi possono regolare negativamente l'attività della 5-LOX con un meccanismo dipendente dalla protein chinasi A (Fig. 9).

L'approfondimento della conoscenza degli eventi molecolari che regolano l'attività della 5-LOX è di estrema importanza e suggerisce criteri aggiuntivi nello sviluppo di nuove sostanze con attività inibitoria su questo enzima, eventualmente utilizzabili per la cura di varie patologie, come quelle infiammatorie, ma anche per la cura del cancro: numerosi studi, infatti, mettono in luce il ruolo svolto dalla 5-lipossigenasi e dagli altri enzimi della famiglia nel promuovere la cancerogenesi (Werz and Steinhilber, Biochemical Pharmacology 2005).

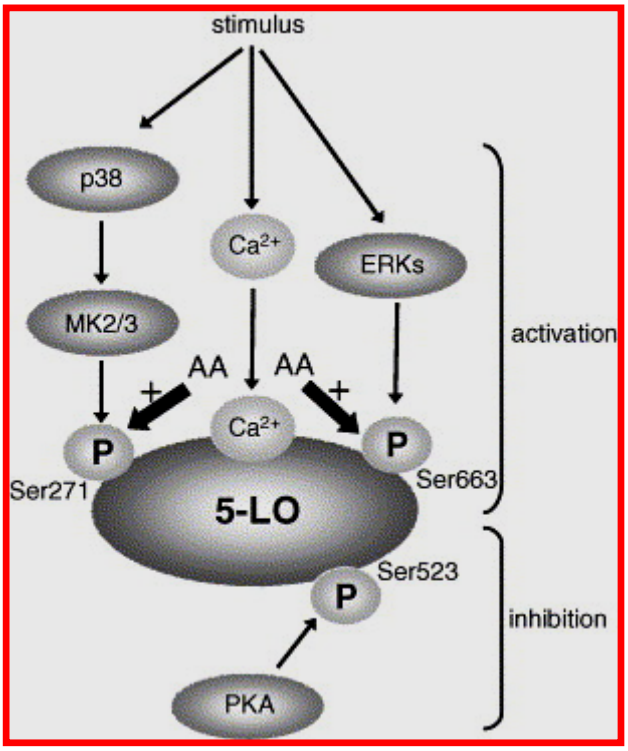


Figura 9: La regolazione dell'attività della 5-LOX prevede oltre ad incrementi del calcio citosolico una serie di eventi fosforilativi: in particolare attraverso la via della p38 MAPK e delle protein chinasi MK viene fosforilata la Ser-271 e attraverso le ERK è fosforilata la Ser-663; entrambi questi eventi attivano la 5-LOX e vengono promossi dall'acido arachidonico rilasciato dalla PLA_2; la fosforilazione della Ser-523 da parte della PKA svolge, invece, un'azione inibitoria sull'enzima.

5.1. Lipossigenasi e carcinogenesi

E' oramai noto che il metabolismo dell'acido acido arachidonico, attraverso gli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi, promuove l'insorgenza e la progressione di vari tipi di cancro: una dieta ricca in acidi grassi polinsaturi omega-6, come l'acido arachidonico e l'acido linoleico, promuove la tumorigenesi; acidi grassi polinsaturi omega-3, come quelli trovati nell'olio di pesce, sembrano avere invece un effetto protettivo (Shureiqi and Lippman, 2001).

L'effetto di promozione della carcinogenesi operato dalle lipossigenasi è per l'esattezza dovuto ai metaboliti prodotti da questi enzimi, ed in particolare agli acidi idrossieicosatetraenoici (HETE), ma anche al LTB4; così linee cellulari tumorali, di diversa origine, esprimono in maniera abnorme ed alterata le LOX rispetto alle loro controparti non tumorali.

Molti studi mostrano che inibitori delle varie isoforme di LOX, assunti attraverso la dieta, esplicano un effetto chemopreventivo, come ad esempio vari tipi di polifenoli (Steele et al., 1999), mentre molto promettenti per il trattamento dei tumori in vivo sembrano essere inibitori specifici di questi enzimi, ottenuti per via sintetica e già utilizzati in studi preclinici; ancora, su linee cellulari tumorali, gli inibitori delle LOX esibiscono una spiccata azione antiproliferativa e inducono apoptosi (Young, 1999).

Uno dei casi più studiati in cui si è riscontrata una alterata espressione delle lipossigenasi è quello del cancro al pancreas e studi epidemiologici hanno dimostrato un effetto protettivo dell'aspirina e di altri farmaci antinfiammatori non steroidei contro questo tipo di tumore (Ding et al., Molecular Cancer 2003). Sia in casi di adenocarcinoma al pancreas, sia in lesioni neoplastiche primarie, sia nelle linee cellulari tumorali MiaPaca2, PANC-1, Capan2 e ASPC-1, ma non in cellule dei dotti pancreatici, è stata osservata una elevata espressione della 5-LOX e della 12-LOX; queste linee cellulari trattate con inibitori delle lipossigenasi o con oligonucletidi diretti contro gli mRNA degli stessi enzimi riducono in maniera significativa la loro proliferazione, un effetto contrastato dalla contemporanea somministrazione dei metaboliti 5-HETE e 12-HETE (Ding et al., 1999). Il potenziale uso degli inibitori delle LOX nella prevenzione e nel trattamento del cancro al pancreas è stato dimostrato anche da studi in vivo con

topi atimici in cui gli inibitori delle lipossigenasi comportano una ridotta crescita di trapianti tumorali (Tong et al., 2002).

Gli acidi grassi polinsaturi omega-6 stimolano la proliferazione anche nel cancro alla prostata attraverso la produzione del metabolita 5-HETE; ancora una volata l'inibizione della 5-LOX mediante MK881, un inibitore di FLAP, induce massicciamente in apoptosi le linee cellulari LNCaP e PC3 (Ghosh and Myers, 1998).

Un ruolo per la isoforma 12-LOX è stato dimostrato in altre linee cellulari di cancro alla prostata PC3 e DU-145 in cui trattamenti con baicaleina e BHPP hanno l'effetto di arrestare il ciclo cellulare in fase G_o/G_1 e di indurre apoptosi accompagnata da una diminuzione della fosforilazione di Akt, dei livelli di survivina e dei livelli di Bcl-2 e Bcl-X_L: anche in questo caso il 12-HETE è in grado di contrastare gli effetti dell'inibizione enzimatica (Pidgeon et al., 2002). L'alterata espressione dell'enzima 12-LOX ha anche l'effetto di incrementare il potenziale metastatico del cancro alla prostata (Nie et al., 2003).

La via trasduzione della 5-LOX media effetti di sopravvivenza sulla linea cellulare di cancro alla mammella MCF-7 in cui trattamenti con NDGA e MK886 inducono apoptosi comportando una diminuzione di Bcl-2 e un incremento di Bax come dimostrato mediante analisi Western Blotting (Avis et al., 2001; Tong et al,2002); ancora la 5-LOX trasduce segnali di sopravvivenza cellulare in linee mesoteliali maligne attraverso la regolazione della produzione e del rilascio del fattore VEGF (vascular endothelial growth factor) che promuove l'angiogenesi (Romano et al., 2001). Gli inibitori della 5-LOX inducono in apoptosi anche cellule di cancro all'esofaringe (Hoque et al, 2005) e gli inibitori della 12-LOX hanno effetti antiproliferativi e apoptogeni su linee cellulari di carcinoma gastrico **(**Wong et al., 2001).

Infine, se si considerano i pochi studi fatti su cellule di origine ematopoietica è stato trovato che la 12-LOX regola la sopravvivenza nella linea W256 di origine monocitica, in linee di leucemia RBL-1, HEL e HL60 (Tang et al., 1997), mentre sia l'inibitore della 5-LOX AA861 sia l'inibitore della 12-LOX baicaleina inducono in apoptosi la linea cellulare di leucemia P388 (Grichenko et al, 2004)

5.2 Trasduzione del segnale mediante HETE

Numerosi tentativi sono stati fatti per cercare di comprendere i processi molecolari in cui intervengono le LOX che contribuiscono allo sviluppo e alla progressione del cancro, e per fare chiarezza sul meccanismo con cui i metaboliti prodotti da questi enzimi producono segnali di sopravvivenza nei diversi sistemi tumorali.

Secondo alcuni autori gli HETE trasducono segnali mitogenici e di sopravvivenza cellulare attraverso l'interazione con particolari recettori nucleari, i PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (Escher P. and Wahli, 2000). Questi recettori appartengono alla stessa famiglia dei recettori per gli ormoni steroidei e tiroidei e sono stati così denominati perché la prima isoforma recettoriale clonata, il PPARα, media gli effetti di particolari composti endogeni o xenobiotici denominati PPs (peroxisome proliferators); i PP dopo una somministrazione cronica a roditori causano infatti un incremento nel numero e nell'attività dei perossisomi del fegato.

Sono note diverse isoforme di PPARs (PPARα, PPAR β/δ e PPARγ) espresse differentemente nei vari tessuti; in particolare i PPARα e PPARγ sono espressi dai macrofagi, dalle cellule dendritiche, dalle cellule B e T (Jones et al., 2002).

I PPARs sono così implicati in vari aspetti dell'immunoregolazione attraverso la loro capacità di modulare l'omeostasi energetica, la composizione delle membrane lipidiche, la proliferazione cellulare, la sensibilità all'apoptosi e l'attività di vari fattori trascrizionali implicati nei processi immunologici (NF-kB, AP-1, STAT, N-FAT) (Daynes and Jones, 2002). Molti agonisti naturali dei PPARs sono acidi grassi polinsaturi o prodotti del metabolismo lipidico; PPARα è attivato da acidi grassi polinsaturi ma anche saturi come il palmitico e monoinsaturi (oleico) oltre che dal LTB4 e dal 8-S-HETE; PPAR β/δ ha come agonisti acidi grassi delle varie classi e anche prostaglandine e prostacicline; PPARγ è attivato dagli acidi α-linoleico e γ-linolenico, dall'acido arachidonico ed eicosapentenoico dal 9-HODE, dal 13-HODE e dalla 15-dPGJ$_2$: tutti gli agonisti naturali dei PPARs interagiscono con le specifiche isoforme a dosi micromolari; ciò indica che questi recettori legano gli agonisti naturali con bassa affinità. Una volta attivati dai loro agonisti i PPARs eterodimerizzano con i recettori per l'acido 9-cis-retinoico, si dissociano da co-repressori, si associano a co-attivatori e legano specifiche sequenze sul DNA attivando la trascrizione dei loro geni bersaglio.

Sembra che i PPARα e PPARγ hanno funzioni opposte nelle cellule e che la stimolazione dei PPARα attiva la proliferazione e sopprime l'apoptosi provocando in particolare epatocarcinogenesi (Boitier et al., 2003), mentre i PPARγ sono coinvolti nell'arresto della crescita e nell'induzione di morte cellulare; per esempio il 15-S-HETE è in grado di legare i PPARγ nella linea cellulare di cancro alla prostata PC3 causando arresto della proliferazione, un incremento delle cellule in fase G_0/G_1 e una riduzione delle cellule in fase S (Shappell et al., 2001). Ancora varie linee cellulari di linfoma, tra cui linee di linfoma di Burkitt (Ramos e Daudi), esprimono i PPARγ e vengono

fortemente indotte in apoptosi dagli agonisti di questi recettori: particolarmente attivo nell'indurre apoptosi è risultato il ligando endogeno dei PPARγ e cioè la $15dPGJ_2$ mentre i ligandi sintetici, come il ciglitazone e il troglitazone, risultano meno potenti (Padilla et al., 2000; Padilla et al., 2002).

Un'altra possibile spiegazione del meccanismo d'azione degli HETE si basa sulla dimostrazione che questi metaboliti, ma anche il LTB4, sono in grado di legare recettori di membrana causando l'attivazione di varie vie di trasduzione del segnale.

E' stato visto che il 12-HETE ha multipli effetti sulle cellule tumorali ed endoteliali poichè stimola la invasività dei tumori (Nie et al., 2003) e l'angiogenesi (Nie et al., 2000). In linee cellulari di carcinoma all'epidermide A431 il 12-HETE induce un'attivazione transiente di ERK1/2; ciò può avvenire in conseguenza della fosforilazione della PLCγ1 che a sua volta attiva la PKCα; oppure il 12-HETE può indurre la fosforilazione di protein-chinasi della famiglia di src e la successiva fosforilazione di proteine adattatrici come Shc e Grb2 che portano all'attivazione di ERK1/2 tramite Ras.

Dato che gli effetti del 12-HETE su queste vie di trasduzione risultano inibite dalla tossina della pertosse si è ipotizzata l'esistenza di recettori di membrana, accoppiati a proteine G, in grado di legare questi composti; non è stato però ancora clonato nessun recettore per il 12-HETE e non si esclude l'esistenza di più recettori in grado di legare questo composto con differente affinità (Szekeres et al., 2000) (Fig.10).

Sia i metaboliti 5-HETE e 12-HETE che il LTB4 esplicano effetti proliferativi e stimolano la fosforilazione in linee cellulari di cancro al pancreas: il 12-HETE produce un'estesa fosforilazione in tirosine e attiva la via di MEK/ERK (Ding et al., 2001); il 5-HETE attiva sia la via di $MEK/p42/44^{MAPK}$ sia la via della PI3K/Akt insieme a PTK

(Ding et al., Oncology 2003); cellule di cancro al pancreas esprimono elevati livelli dei recettori per il LTB4 (BLT1 e BLT2) attraverso i quali avviene la stimolazione di

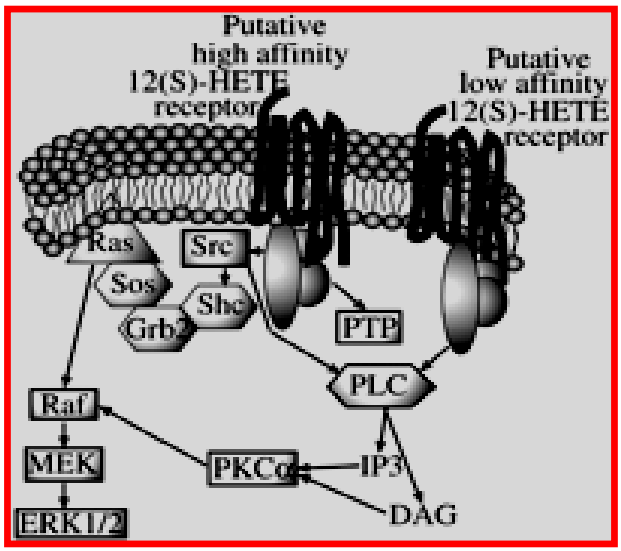


Figura 10: L'immagine descrive le possibili via di trasduzione del segnale in cui interviene il 12-HETE che portano all'attivazione della via di ERK1/2 come è stato descritto in linee cellulari di carcinoma all'epidermide A431. Il 12-HETE sembra agire attraverso recettori di membrana associati a proteine G; infatti tale segnalazione recettoriale risulta inibita dalla tossina della pertosse. Anche se non è stato ancora clonato alcun recettore, non si esclude l'esistenza di più recettori putativi in grado di legare il 12-HETE con diversa affinità.

ERK1/2 (Hennig et al, 2002); un antagonista specifico di questi recettori LY 293111 è così in grado di bloccare la proliferazione e di indurre apoptosi in cellule di cancro al pancreas, sia in vivo che in vitro, e se ne sta valutando il potenziale uso in protocolli chemioterapeutici (Tong et al., 2002).

Il 5-HETE trasduce segnali che stimolano la crescita anche in linee cellulari di cancro alla prostata PC3 attivando sempre le ERK e Akt; anche in questo caso gli effetti sembrano mediati dall'interazione tra il 5-HETE e recettori accoppiati a proteine G (O'Flaherty et al., 2002).

Infine una correlazione tra metabolismo delle LOX e vie di trasduzione del segnale, questa volta con valenza pro-apoptotica, è stata trovata in linee cellulari di cancro alla prostata LNCaP e PC3; in queste linee, dopo inibizione della 5-LOX mediante i composti MK886 e AA861, si osserva induzione di apoptosi accompagnata dall'attivazione di JNK e dalla fosforilazione del suo substrato più a valle c-jun; tali effetti possono essere ridotti dalla contemporanea somministrazione di 5-HETE o degli inibitori di JNK curcumina e SP600125; non è comunque noto il preciso meccanismo con cui la fosforilazione di JNK inneschi questa rapida apoptosi (Ghosh et al., 2003).
La ricerca sulla trasduzione del segnale mediata dagli HETE e dai leucotrieni è ancora all'inizio e molto lavoro deve essere svolto; mentre alcuni sistemi cellulari sono stati oggetto dei primi tentativi di fare luce su questi aspetti della cancerogenesi altri potenziali campi di studio sono ancora assolutamente inesplorati: per esempio non è affatto nota l'espressione delle varie isoforme delle LOX nei linfomi umani e se metaboliti come gli HETE e i leucotrieni agiscono su questi tumori solidi a livello locale come mediatori di sopravvivenza e di resistenza all'apoptosi, promuovendo la crescita e l'invasività dei linfomi stessi.

5.3 Gli inibitori delle LOX

Considerato il ruolo svolto dal metabolismo dell'acido arachidonico nel promuovere la carcinogenesi e gli effetti proliferativi e stimolanti la crescità e l'invasività dei tumori dimostrati dagli HETE e dal LTB4, si è già sottolineato il potenziale uso degli inibitori delle LOX sia nella prevenzione che nel trattamento del cancro (Young et al., 1999).

Vari tentativi sono stati fatti per identificare sostanze presenti in natura con attività inibitoria sulle lipossigenasi e per modificare chimicamente questi substrati in maniera tale da ottenere composti con potenziate attività biologiche e con inferiori effetti tossici.

Gli inibitori della 5-LOX possono agire con molteplici meccanismi d'azione e si distinguono varie classi di composti: esistono inibitori redox, inibitori che legano il ferro al sito attivo dell'enzima, inibitori non redox e ancora inibitori che agiscono sulla proteina FLAP; molti degli inibitori della 5-LOX sono disponibili commercialmente e sono usati per la cura dell'asma (Julèmont et al., 2003).

Inibitori con attività redox sono composti come il lignano NDGA, cumarine e flavonoidi che però mostrano severi effetti collaterali come la produzione di metaglobina oppure questi composti vengono metabolizzati troppo rapidamente e ciò preclude il loro uso nella clinica; essi interferiscono con il ciclo catalitico della 5-LOX riducendo l'atomo di ferro al sito attivo dell'enzima; si sa che per la funzionalità dell'enzima stesso tale atomo si deve trovare nella forma ossidata (Werz et al., 2005).

Tra gli inibitori redox vi è anche il composto denominato AA-861, un chinone lipofilico che assomiglia strutturalmente al coenzima Q, prodotto dalle industrie chimiche Takeda, e che inibisce potentemente la 5-LOX .

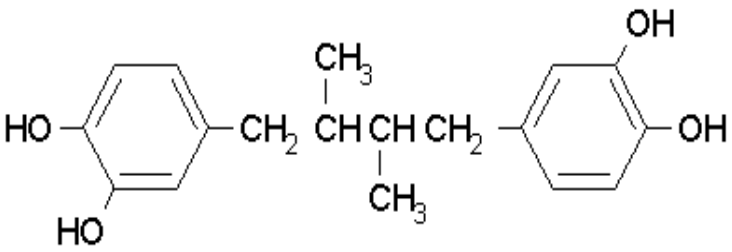
Un'altra importante classe di composti che agiscono sulla 5-LOX sono i derivati della N-idrossi-urea che vanno a chelare l'atomo di ferro; tra questi molto importante è lo zileuton che ha ricevuto l'approvazione della FDA per l'uso nella clinica per la cura dell'asma (McGill et al., 1996); ma la potenziale azione antiproliferativa di questo composto e dei suoi derivati per il trattamento del cancro non è mai stata studiata.

Composti in grado di chelare il ferro al sito catalitico della 5-LOX sono ancora i derivati dell'acido idroxammico come per esempio il BWA4C (Steele et al., 1999).

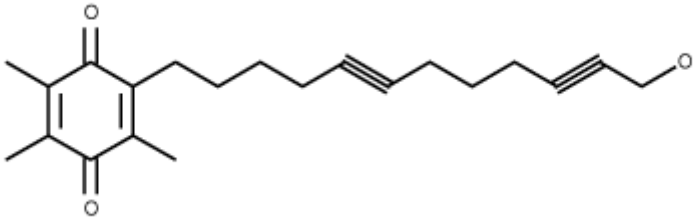
Tra gli inibitori della proteina FLAP si può ricordare il composto denominato MK886 prodotto dalla Merck, la cui azione contro l'asma è stata valutata anche clinicamente: questo composto interagisce con il sito di legame dell'acido arachidonico sulla proteina FLAP ed esibisce una potente azione antiproliferativa e citotossica.

Flavonoidi naturali come l'Esculetina, un derivato cumarinico del *Aesculus hippocastanum*, e la Baicaleina, un flavonoide della *Scutellaria baicalensis*, mostrano invece una forte attività inibitoria sulla isoforma 12-LOX; altri inibitori della 12-LOX sono il BHPP, un acido idroxammico dotato di attività antiproliferative o ancora il CDC (cinnamyl-3,4-dihydroxy-α-cyanocinnamate).

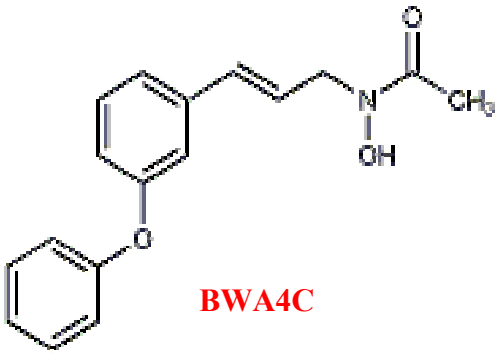
L'identificazione di nuovi inibitori delle lipossigenasi da fonti naturali e da piante medicinali rappresenta un ampio campo di ricerca le cui potenzialità non sono state ancora completamente esplorate (Schneider and Bucar, 2005).



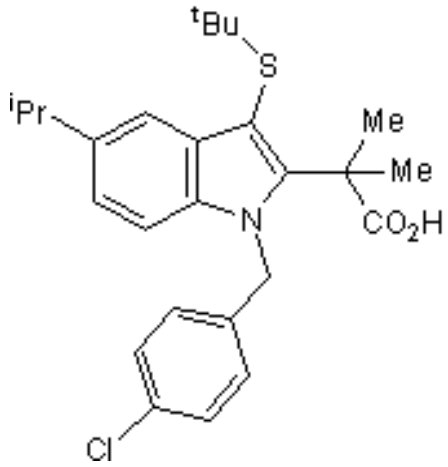
NDGA



AA-861



BWA4C



MK-886

Figura 11: Strutture chimiche di noti inibitori della 5-LOX: sono riportate in particolare le strutture chimiche dei composti utilizzati in questo studio. Gli inibitori della 5-LOX possono agire con diversi meccanismi d'azione: possono avere un meccanismo redox come le molecole NDGA e AA-861, possono chelare l'atoimo di ferro al sito attivo dell'enzima come nel caso del BWA4C o possono inibire FLAP come nel caso del MK-886

PRESENTAZIONE E SCOPO DEL LAVORO

Questo lavoro rappresenta il primo tentativo di chiarire il ruolo svolto dalle lipossigenasi, che metabolizzano l'acido arachidonico producendo HETE (acidi idrossieicosatetraenoici) e leucotrieni, nella sopravvivenza/apoptosi di cellule B.

Il sistema cellulare utilizzato in questo studio comprende la linea BL41, di linfoma di Burkitt, ed i cloni isogenici da questa linea derivanti dopo conversione con il virus di Epstein-Barr; in particolare la linea cellulare EBV+ denominata E2R è il clone caratterizzato dal più elevato grado di resistenza all'apoptosi e dalla over-espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 (pur in assenza di espressione del fattore virale LMP1).

I cloni convertiti con il virus di EB hanno alti livelli di perossidi intracellulari direttamente correlati con la resistenza all'apoptosi e studi precedenti suggeriscono che alla generazione di tale stato ossidativo spontaneo possano contribuire particolari sistemi enzimatici ed in particolare gli enzimi del metabolismo dell'acido arachidonico lipossigenasi .

Quindi lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare mediante RT-PCR qualitativa e mediante Light Cycler quali isoforme lipossigenasiche sono maggiormente espresse nei cloni EBV+.

E' noto, da studi fatti su altri sistemi cellulari, che le LOX mediano segnali di sopravvivenza; è stato quindi molto interessante valutare l'effetto citotossico di noti inibitori delle LOX sulle linee di linfoma BL41 ed E2R e studiare l'effetto protettivo esplicato dagli HETE sull'apoptosi che si produce dopo inibizione enzimatica: un altro

scopo del presente lavoro è stato quello di studiare le vie di trasduzione del segnale in cui intervengono gli HETE.

Si è quindi cercato di delineare le vie apoptotiche attraverso cui si attua il programma di morte, in particolare dopo inbizione dell'isoforma 5-LOX; ciò ha permesso di chiarire alcuni dei meccanismi su cui si basa la resistenza all'apoptosi solitamente osservata nella linea E2R ed il coinvolgimento di proteine antiapoptotiche come X-IAP e Bcl-2 e di altri fattori rilasciati dai mitocondri come Smac e il citocromo c che influenzano in maniera determinante la risposta cellulare all'attivazione delle caspasi.

Le nostre linee cellulari sono state inoltre utilizzate per saggiare l'attività citotossica e la potenziale azione inibitrice sulle LOX di lignani ariltetralinici di neo-sintesi, in particolare di alcuni derivati benzochinonici dalla sostanza naturale Galbulina della *Galbulimima belgraveana* con il fine ultimo di identificare nuove sostanze ad azione chemioterapeutica.

MATERIALI E METODI

COMPOSTI CHIMICI:

- **Agenti apoptogeni:**
- Puromicina (Sigma): inibitore della sintesi proteica, è solubilizzato in PBS alla concentrazione di 1 mg/ml e conservata a -20^{o} C.
- Valinomicina (Sigma): inonoforo del potassio, è solubilizzato in DMSO alla concentrazione di 10 μg/ml e conservato a -20^{o} C.
- VP16 (Sigma): etoposide, è un inibitore della topoisomerasi II; viene sciolto in DMSO alla concentrazione di 100 mM ed è conservato a -20^{o} C.
- m-AMSA (Sigma): Amsacrine hydrochloride; è un inibitore della topoisomerasi II, viene sciolto in DMSO e conservato a -20^{o} C.
- **Inibitori enzimatici**:
- AA861(Sigma): 2-[12-Hydroxydodeca-5,10 diynil]-3,5,6-trimethyl-p-benzoquinone; inibitore specifico della 5-LOX ; viene diluito in EtOH alla concentrazione di 10 mM e conservato a –80^{o} C.
- Baicaleina: 5,6,7-triidrossiflavone: (Calbiochem): inibitore della 12-LOX, è sciolta in DMSO alla concentrazione di 100 mM e conservata a –80^{o} C.
- NDGA(Sigma): nordihydroguaiaretic acid: inibitore generico delle LOX è sciolto in DMSO alla concentrazione di 50 mM e conservato a –80^{o} C.
- MK886 (Biomol): inibitore di FLAP e quindi della 5-LOX è sciolto in DMSO alla concentrazione di 100 mM e conservato a –80^{o} C.
- BW A4C (Sigma): N-[(E)-3-(3-Phenoxyphenil)prop-2-enyl]acetohydroxamic acid; è sciolto in DMSO alla concentrazione di 100 mM e conservato a –80^{o} C.

- Allopurinolo (Sigma): inibitore della xantina ossidasi, è solubilizzato in DMSO alla concentrazione di 10 mM e conservato a -20^{o} C.
- Indometacina (Sigma): inibitore delle COX 1 e 2, è sciolto in DMSO alla concentrazione di 10 mM e conservato a -20^{o} C.
- Diclofenac (Sigma): inibitore delle ciclossigenasi, è sciolto in DMSO e conservato a-20^{o} C.
- L-NAME: NG-Nitro-L arginine-methyl ester.HCl (Alexis): inibitore della iNOS, è sciolto in acqua alla concentrazione di 10 mM e conservato a -20^{o} C.
- CAPE: 3-(3,4-Diydroxyphenyl)-2propeonic phenyl estere: (Alexis); inibitore generico delle lipossigenasi è conservato a -20^{o} C.
- **Inibitori di vie di traduzione del segnale:**
- Parthenolide (Sigma): inibisce NF-kB, è disciolto in DMSO alla concentrazione 10 mM è conservato a -20^{o} C.
- Wortmannina (Biomol): inibitore della via di PI3K/Akt, è sciolta in DMSO e conservata a -20^{o} C.
- SB-203580 (Biomol): inibitore della P38 MAPK è sciolto in DMSO e conservato a -20^{o} C.
- SP-600125: inibitore di JNK 1,2 e 3; viene sciolto in DMSO e conservato a -20^{o} C.
- PD-98059: inibisce MEK (MAP chinasi chinasi); è sciolto in DMSO e conservato a -20^{o} C.
- **Agonisti dei PPARs:**
- Troglitazone (Biomol): agonista sintetico PPARγ; è sciolto in DMSO e conservato a-20^{o} C.
- Clofibrate (Sigma): agonista sintetico dei PPARα

- Wy (Sigma): agonista sintetico dei PPARα
- 15-dPGJ2 (Sigma): (15-Deoxy-$^{\Delta 12,14}$-Prostaglandin J_2); agonista endogeno dei PPARγ
- **Inibitori delle Caspasi:**
- Inibitore caspasi 3 (Z-DEVD-FMK), (Alexis): inibitore irreversibile delle caspasi 3 e 7; la soluzione madre, alla concentrazione di 10mM in DMSO, si conserva a -20°C. Il trattamento è condotto su 100µl di cellule diluite a 500000 cell/ml, ad una concentrazione finale di 50µM.
- Inibitore caspasi 8 (Ac-IETD-CHO), (Alexis): inibitore reversibile di caspasi 8 e gramzyme B. Viene sciolto in DMSO ad una concentrazione finale di 20mM e la soluzione viene conservata a -20°C. I trattamenti sono condotti su 200µl di cellule diluite a 500.000 cell/ml ad una concentrazione finale di 100µM.
- Inibitore caspasi 9 (Alexis) : inibitore irreversibile; la soluzione madre ha una concentrazione di 1mM (RPMI) e viene conservata a -20°C.
- **Metaboliti delle LOX:**
- 5(±)-HETE: (±)-5-Hydroxy-(6E,8Z,11Z,14Z)-Eicosatetraenoic acid; viene acquistato dalla Sigma (66 µg/ml) e conservato a –80^{o} C; prima del trattamento viene diluito in EtOH alla concentrazione finale di 30µM.
- 12-(S)-HETE: 12(S)-Hydroxy-(5Z,8Z,10E,14Z)-eicosa-tetraenoic acid; viene acquistato dalla Sigma (100µg/ml) e conservato a –80^{o} C; prima dal trattamento viene diluito in EtOH alla concentrazione di 30 µM.
- 15-(S)-HETE:15(S)-Hydroxyeicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenoic acid; viene acquistato dalla Biomol (1mg/ml)e conservato a –80^{o} C; prima del trattamento viene diluito in EtOH alla concentrazione finale di 30µM.

- 13-S-HODE: 13-S-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoic acid; viene acquistatao dalla Biomol, è sciolto in EtOH e conservalto a –80^{o} C.
- **Antiossidanti:**
- Trolox (Alexis): è sciolto in RPMI alla concentrazione di 100 mM e conservato a
- **Anticorpi:**
- Anticorpo monoclonale murino IgG1 anti-BCL2 umana (Ancell) è conservato a +4^{o} C ed è usato sia per l'analisi citofluorimetrica sia per Western Blot .
- NLC-EBV-CS1-4: anticorpo monoclonale murino contro LMP1 è acquistato dai Laboratori Novocastra
- Anticorpo monoclonale murino IgG_{2b} purificato anti-citocromo c (BD Biosciences Pharmigen) clone 7H8.2C12; è conservato a +4^{o} C e viene utilizzato in diluizione 1:3000 da una concentrazione iniziale di 500 μg/ml.
- hILP/XIAP (BD Bioosciences Pharmigen)**:** anticorpo monoclonale IgG1 murino anti-XIAP, clone 48, viene utilizzato in diluizione 1:1000 da una concentrazione iniziale di 250 μg/ml.
- Smac/DIABLO: (BD Bioosciences Pharmigen)**:** anticorpo monoclonale IgG1 murino anti-Smac, clone 7, viene utilizzato in diluizione 1:1000 da una concentrazione iniziale di 250 μg/ml.
- Anticorpo monoclonale murino IgG1 anti-caspasi 9 umana (BD Bioosciences Pharmigen), clone 2-22, viene utilizzato in diluizione 1:1000 da una concentrazione iniziale di 125 μg/ml.
- Caspase-3/CPP32 (BD Bioosciences Pharmigen)**:** anticorpo monoclonale IgG2a murino anti-caspasi 3, clone 32, viene utilizzato in diluizione 1:1000 da una concentrazione iniziale di 250 μg/ml.

- Anticorpo secondario (Amersham): anticorpo monoclonale anti IgG murina coniugato ad HRP (Horseradish Peroxidase).
- **Sonde Citofluorimetriche:**
- 2',7'-diclorodiidrofluoresceinadiacetato (DCFH-DA) (Sigma): sonda sensibile all'ossidazione da parte di H2O2 e ONOO-. Viene sciolta in DMSO alla concentrazione finale di 5mM e conservata a –20^{o}C.

LINEE CELLULARI

Il sistema cellulare utilizzato comprende linee derivanti da un linfoma di Burkitt:

- **BL 41**: derivante da un linfoma di Burkitt sporadico (Calendar et al., 1987) è EBV negativa ed è particolarmente sensibile ad andare in apoptosi; tale linea cellulare è mutata nella funzione del gene p53 ed è caratterizzata da un livello di micronuclei spontaneo pari a circa il 2%.
- **E2b, HS1:** cloni cellulari ottenuti per infezione della linea parentale BL41 con il ceppo del virus di Epstein-Barr non difettivo B95-8. Il clonaggio è eseguito mediante diluizione limite.
- **E2R:** variante cellulare ottenuta per progressione cellulare in vitro del clone E2b, è tra tutte le linee cellulari quella più resistente agli stimoli apoptogeni.
- **CLF:** linea linfoblastoide creata in vitro per immortalizzazione di linfoblasti derivati da un donatore sano

Attraverso l'analisi Southern si è verificata la presenza nei cloni EBV+ di una singola copia di genoma virale integrata per cellula; in particolare nel clone E2b è stata evidenziata una delezione che si estende dalla regione virale TR alla regione IR; inoltre

nel clone cellulare HS1 è presente una delezione più estesa che comprende la regione codificante per LMP1.

COLTURE CELLULARI

Le diverse linee cellulari linfoidi sono coltivate in vitro in sospensione in un mezzo composto dal 90% di RPMI 1640 con l'aggiunta di antibiotici (penicillina 100 UI/ ml , streptomicina 100 UI/ml e gentamicina 50 µg/ml), di L-glutammina 200 mM e del 10% di siero fetale bovino inattivato (56 ^{o}C per 20 min). Le colture sono mantenute in un incubatore termostatato a 37^{o}C in atmosfera arricchita in CO_2 al 5% .

ANALISI MORFOLOGICA

L'analisi morfologica permette di mettere in evidenza e di quantificare cellule con una tipica morfologia nucleare apoptotica. Le cellule (3 X 10^5 cellule/ml) sono centrifugate per 10 minuti a 1200 rpm in tubi eppendorf e il pellet ottenuto viene risospeso e fissato mediante 30 µl di paraformaldeide al 4% per 1-24 h .

Le cellule fissate possono essere seminate su vetrini gelatinati e possono essere colorate con una soluzione di ematossilina (Sigma) allo 0,1% per dieci minuti. Dopo la colorazione i vetrini sono sciacquati, asciugati e sigillati con eukitt. L'analisi è portata a termine mediante il microscopio ottico in immersione usando un ingrandimento di 1000 X, e contando la percentuale di cellule con nucleo condensato e frammentato su un totale di 500 cellule.

Alternativamente le cellule fissate possono essere colorate con il colorante fluorescente DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) alla concentrazione di 0.2 µg/ml. Il DAPI lega con affinità le regioni di DNA ricche in AT permettendo di distinguere ancora più chiaramente le morfologie apoptotiche dai nuclei distesi di cellule interfasiche. L'analisi

è eseguita mediante microscopia a fluorescenza considerando che per il DAPI la lunghezza d'onda di eccitamento è 355 nm mentre l'emissione si verifica a 450 nm (filtro Blu-Green 450-490 nm).

RT-PCR e PCR-REALTIME

Estrazione dell'RNA: circa 5-10 x 10^6 cellule vengono omogenizzate in 1 ml del reagente TRIzol™ (Gibco Life-Technologies).

I campioni omogeneizzati sono incubati a 15-30° C per 5 minuti, per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici, quindi vengono aggiunti 0,2 ml di cloroformio per ogni ml di TRIzol. Dopo aver agitato i tubi con il campione per 15 secondi e dopo un'incubazione a 15-30° C per 2-3 minuti, si centrifuga a 12.000 x g per 15 minuti a 2-8 ° C.

A seguito della centrifugazione si separano una fase più in basso rossa, corrispondente alla fase fenolo-cloroformio, una interfase e una fase superiore acquosa. L'RNA si trova esclusivamente nella fase acquosa e da questa si fa successivamente precipitare aggiungendo 0,5 ml di isopropanolo per ogni ml di TRIzol; i campioni sono incubati a 15-30 ° C per 10 minuti e centrifugati a 12.000 x g per 10 minuti a 2-8 ° C; in tal modo l'RNA, invisibile prima della centrifugazione, forma un pellet. Il supernatante è rimosso mentre il pellet viene lavato con etanolo al 75% (1ml di EtOH per ogni ml di TRIzol); dopo un vigorosa agitazione il lavaggio è completato centrifugando a 7.500 x g per 5 minuti a 2-8 ° C.

Il surnatante viene eliminato ed il pellet di RNA deve essere opportunamente portato a secco in maniera tale da non ridurne la solubilità; infine il pellet viene risospeso in 20 μl

di acqua DEPC(Sigma) cioè contenente lo 0,01% di dietilpirocarbonato per proteggere l'RNA stesso.

La concentrazione dell'RNA estratto è trovata allo spettrofotometro misurando l'assorbanza a 260 nm, mentre la purezza dell'RNA è trovata dal rapporto A_{280}/ A_{260} che deve essere maggiore o uguale a 1,8. I campioni sono quindi diluiti alla concentrazione di 1µg/ml e l'integrità dell' RNA viene verificata caricando 4µl dell'estratto su un gel di agarosio al 1% sottoposto ad elettroforesi orizzontale mediante un apparecchio 'Mini Sub^{TM} DNA Cell' (Biorad) in un Buffetr TBE (1X); le bande sono visualizzate mediante Bromuro di Etidio sotto raggi UV.

Sintesi del DNA complementare: l'RNA totale (1µg) viene incubato con 1,5 µl di oligo (dT) (0,5 µg/µl, Invitrogen) a 70^{o} C per 10 minuti e quindi a 4^{o} C per cinque minuti. Ai campioni RNA-oligo(dT) viene successivamente aggiunta una mistura di reazione per la trascrizione inversa, per un volume finale di 20 µl, contenente acqua trattata con lo 0,01% di DEPC, 25 mM di TRIS-HCl (PH=8,3), 50 mM di KCl, 2mM di DTT, 5 mM di $MgCl_2$, 1 mM di dGTP, dTTP, dCTP e dATP, 1U/µl di RNAsin^{TM}, 10 U/µl dell'enzima Trascrittasi Inversa AMV (FINNZYMES OY). I campioni sono quindi incubati a 42^{o} C per 40 minuti e conservati a -20^{o} C.

Selezione dei Primer: Le coppie dei primer sono disegnate utilizzando il Software 'LightCycler Probe Design'(Roche Applied Science) ed utilizzando le sequenze degli mRNA presenti nella banca dati on-line 'GeneBank ^{TM}' Le specifiche sequenze oligonucleotidiche sono: per la 5-LOX: 5'-GAAGGACCTGACCTAT (forward), 5'-CCGTACACGTAGACAT (reverse) che generano frammenti di 228 bp; per la 12-

LOX: 5'-CCCATACCCGATACAC (forward), 5'-CCTATAATGATGGCGCT (reverse) che generano un frammento di 214 pb ; per la 15-LOX1: 5'-CCAACGTCATTCTCTG (forward), 5'-GGATGTATCGACGGCA (reverse) che generano una frammento di 295 bp; per la 15-LOX2: 5'-CACATCAACACACTCG (forward), 5'-CACGGTAGTAGTAGCC (reverse) che generano un frammento di 193 bp; per la COX1: 5'-TGTCCTCCCCTATTGC (forward), 5'-CTGTCAGACCGAACTC (reverse) che generano un frammento di 234 pb; per la COX2: AGATCATAAGCGAGGG (forward), CTGTGGGATACAT (reverse) che generano un frammento di 213 pb; per FLAP: 5'-GGTGGAGATGGTCTTT (reverse), 5'-CTTTGAGCGGGTCTAC (forward) che generano un frammento di 310 pb ed infine per l'actina: 5'-GATCCACACGGAGTACTT forward), 5'-TGTGGCATCCACGAAACT (reverse) che generano un frammento di 190 pb.

PCR Standard: Un Buffer di reazione per PCR (EuroClone) viene aggiunto a 4 µl del prodotto della trascrizione inversa fino ad un volume finale di 50 µl; i costituenti del Buffer sono: H_2O_2-DEPC 0,01%,$(NH_4)_2SO_4$ 16 mM, TRIS-HCl(PH=8,8) 67 mM, Tween-20 0,01%, $MgCl_2$ 2mM (EuroClone), dNTP 200 µM, 0,5 µM di ogni primer e 2,5 unità di DNA polimerasi Taq (EuroTaq, EuroClone).

La miscela di reazione è quindi trasferita su un apparato per PCR (PCR Sprint, ThermoHybaid) e l'amplificazione per ogni sequenza bersaglio viene così eseguita: 1 ciclo di 10 minuti a 94^{o}C e successivi 30 cicli di 1 minuto a 94^{o}C (denaturation), di 1 minuto e 30 secondi a 55 ^{o}C (annealing) e di 1 minuto a 72 ^{o}C (extention); infine è eseguito un ciclo di 10 minuti a 72 ^{o}C.

Aliquote del prodotto di amplificazione per PCR vengono caricate su un gel di agarosio al 1,5% e separate per elettroforesi mediante un Buffer TAE (TRIS-acetato 40mM, EDTA 1 mM, PH=7,5) contenente Bromuro d'Etidio (5 µg/ml). Per escludere eventuali contaminazioni con DNA geomico i campioni di RNA vengono amplificati per PCR senza aver eseguito prima la trascrizione inversa.

PCR cinetica in Real-Time: la PCR cinetica è stata eseguita solo per la 5-LOX mediante una LightCycler ^{TM} (Roche Diagnostic) utilizzando il colorante SYBR® Green I che diventa fluorescente quando lega in maniera specifica la doppia elica del DNA; l'incremento della fluorescenza è quindi proporzionale al processo di amplificazione e permette di fare delle misurazioni quantitative.

L'amplificazione viene eseguita in capillari di vetro (boro-silicato) in un volume totale di 20 µl contenente 0,5 µM di ogni primer, 3mM di $MgCl_2$, 10 µl di una Master Mix QuantiTect SYBR Green (Qiagen)(2X) (contenente DNA Polimerasi HotStartaq ^{TM}, un Buffer QuantiTect SYBR Green , una miscela di dNTP contenente anche dUTP, SYBR green I, un colorante referente passivo ROX e 5 mM di $MgCl_2$) e 1 µl di cDNA diluito come descritto di seguito per la generazione delle curve standard.

Il programma di reazione per la PCR prevede, dopo un ciclo iniziale di denaturazione di 95^{o} C per 15 minuti, 45 cicli secondo il seguente schema: 15 secondi a 94^{o} C (denaturation), 20 secondi a 55^{o} C (annealing), 10 secondi a 72 ^{o}C (extention) con una velocità di transizione tra le temperature di 20^{o} C/s. La fluorescenza viene letta alla fine di ogni fase di annealing.

L'analisi delle curve 'melting' e dei prodotti di amplificazione è invece eseguita alla fine della reazione di PCR riscaldando i campioni a 40 ^{o}C e quindi incrementando la

temperatura fino a 95 ^{o}C alla velocità di 0,2^{o} C/s. In questo caso la fluorescenza viene acquisita ogni 0,1 secondi.

L'identificazione dei prodotti della reazione di PCR viene fatta sia attraverso l'analisi delle curve di 'melting' ma anche determinando la lunghezza (pb) del prodotto della PCR. In quest'ultimo caso, dopo il completamento della reazione di PCR mediante il sistema LightCycler il contenuto dei capillari di vetro viene recuperato in tubi di plastica e 20 µl di ogni amplificato in PCR viene visualizzato per elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con Bromuro d'Etidio.

Curve Standard: per costruire le curve standard e per portare a termine una quantificazione relativa, vengono riportati i valori dei Cp (Crossino-Point) sia per una sequenza 'Target'che per una sequenza 'Reference' rispetto a delle diluizioni seriali 2X di un campione di cDNA; nel nostro caso è stato utilizzato del cDNA derivante dalla linea cellulare E2R e ogni diluizione fatta è stata saggiata in triplicato.

Ogni diluizione per la curva standard veniva analizzata con la PCR LightCycler usando sia i primers per la beta-actina (Reference) che per la 5-LOX (Target) e per ogni set di primers, ad ogni diluizione, veniva determinato a quale numero di cicli veniva a corrispondere il Crossing Point.

L'analisi mediante regressione lineare del logaritmo del fattore di diluizione vs il crossing point e il numero di cicli permette di produrre per ogni prodotto di una coppia di primers una curva standard.

Quantificazione Relativa: per un qualunque campione è quindi possibile determinare il numero di cicli a cui si verifica il crossing point mediante un sistema PCR LightCycler.

Quindi utilizzando un Software di Quantificazione Relativa la quantità di cDNA specifico per la 5-LOX può essere espressa come proporzione relativa (normalizzata rispetto ad un calibratore) del cDNA della beta-actina. Il Software di Quantificazione Relativa porta a termine automaticamente una quantificazione corretta rispetto all'efficienza del processo ed è basata sulle curve standard che descrivono le efficienze delle PCR sulle sequenze Target e Reference.

WESTERN BLOTTING

Estrazione Proteica: Circa 10 x 10^6 cellule sono raccolte per portare a termine l'estrazione delle proteine.

Per studiare l'espressione di proteine come Bcl-2 e XIAP o ancora per le caspasi 3 e 9 è stato eseguito il seguente protocollo di estrazione delle proteine totali: le cellule sono raccolte e dopo due lavaggi in PBS a 1200 rpm per 10 minuti sono lisate mediante 100 µl di un Buffer (TRIS-HCl PH=7,4 10mM; MgCl2 3mM; NaCl 10 mM; SDS 0,1%; Triton X-100 0,1%; EDTA 0,5 mM; DTT 1mM) a cui viene aggiunto un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma) (1 µl di cocktail per milione di cellule).

Il Buffer viene fatto agire in ghiaccio per circa 5 minuti quindi il campione è centrifugato a 14.000 rpm per 10 minuti e il surnatante, che rappresenta l'estratto proteico, viene raccolto e conservato a – 80° C.

Per studiare invece il rilascio nel citosol di particolari fattori mitocondriali, quali il citocromo c e Smac, è stato eseguito un frazionamento delle proteine citosoliche e mitocondriali. Più precisamente le cellule, dopo i lavaggi in PBS, sono sottoposte all'azione di un Buffer permeabilizzante, che non compromette l'integrità dei mitocondri; 100 µl di Buffer (Saccarosio 250 mM, Hepes PH=7,4 20 mM, $MgCl_2$ 5

mM, KCl 10 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1mM), contenente Digitonina allo 0,05% e inibitori di proteasi, vengono aggiunti alle cellule e fatti agire in ghiaccio per 20 minuti.

Il campione viene quindi centrifugato a 14.000 rpm per 10 minuti e il surnatante, che rappresentanta la frazione citosolica, viene raccolto e conservato a – 80° C. Il pellet è successivamente lisato con lo stesso Buffer utilizzato per estrarre le proteine totali, poco sopra descritto, per 5 minuti in ghiaccio; il surnatante raccolto dopo centrifugazione rappresenta la frazione mitocondriale e viene conservato a – 80° C.

Dosaggio Proteico: Il dosaggio delle proteine sugli estratti cellulari viene eseguito con il Micrometodo Bradfor. Si costruisce una retta di taratura mediante diluizioni successive (1-3-6-7,5- 10,5 µg) di BSA (albumina di siero bovino) e utilizzando il colorante Bio-Rad (BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate), 200 µl per 1 ml totale di campione utilizzato nella misurazione spettrofotometrica; l'assorbanza viene misurata a 595 nm.

Il saggio delle proteine con il Bio-Rad si basa sul cambiamento di colore del Coomassie brilliant blue G-250 in risposta alle varie concentrazioni di proteine; il colorante si lega in particolare ai residui amminoacidici basici (specialmente arginina) e aromatici. Quindi calcolando l'assorbanza relativa di 3µl di estratto proteico, mediante la retta di taratura (Assorbanza=a+b µg) è possibile normalizzare il caricamento del gel di poliacrilammide per portare a termine una SDS-PAGE. In genere sono caricati 30-40 µg di estratto proteico per ogni pozzetto.

SDS-PAGE: L'analisi elettroforetica delle proteine viene eseguita su gel di poliacrilammide in condizioni che assicurano la dissociazione delle proteine nelle loro catene polipeptidiche; per questo motivo viene utilizzato il detergente anionico SDS in combinazione con agenti riducenti e con il calore per dissociare le proteine prima che queste vengono caricate sul gel. Si mescola l'estratto proteico con uno stesso volume di Sample Buffer 2X (TRIS Hcl pH 6.8 0.125M, Glicerolo 20%, SDS 4%, 2ß-mercaptoetanolo 1.45 M, blu di bromofenolo 0.1%) e si esegue la bollitura per 10 minuti.

Per eseguire la corsa elettroforetica il sistema più comunemente ustato è quello discontinuo in cui il Sample Buffer e lo Stacking Gel contengono TRIS-HCl PH=6,8, il Buffer di corsa contiene TRIS-Glicina a PH= 8,3 (soluzione madre 5X: Tris-base 0.025M, Glicina 0.192M, SDS 0.1%) e il Resolvin Gel contiene TRIS-HCl PH=8,8.

Nel Resolving Gel vengono quindi aggiunte percentuali diverse di poliacrilammide in maniera tale da ottenere la separazione della proteina di interesse nella maniera più opportuna. Più precisamente si prepara un gel al 14% per separare il cit c, Smac, Bcl-2; un gel al 12% per la caspasi 9 e la pro-caspasi 3; mente si utilizza un gel al 10% per separare XIAP. Le proteine vengono sottoposte alla corsa utilizzando una cella elettroforetica Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad) applicando una differenza di potenziale costante di 100 V a temperatura ambiente (Tank Buffer: Tris-base 0,025M, Glicina 0,192 M, SDS 0'1%).

La separazione delle proteine viene seguita mediante marker (Sigma, High Range) contenente una miscela di 5 proteine a peso molecolare noto ognuna coniugata ad un differente colorante.

ImmunoBlotting: l'immunoblotting è utilizzato per identificare le dimensioni e il peso di antigeni macromolecolari, usualmente proteine, che reagiscono con specifici anticorpi. Le proteine separate elettroforeticamente attraverso un gel di poliacrilammide-SDS vengono trasferite dal gel ad un supporto solido; nel nostro caso è stata utilizzata una membrana in PVDF (polyvinylidene fluoride) (Hybond-P, Amersham Biosciences); la membrana, prima di preparare il 'sandwich', con le apposite spugnette, la carta e il gel, deve essere opportunamente trattata. Infatti il materiale PVDF è resistente ai trattamenti meccanici e stabilisce delle forti interazioni idrofobiche interfacciali con le proteine trattenendole con elevata affinità; nello stesso tempo è necessario attivare la superficie idrofobica della membrana con metanolo al 100%.

Per il trasferimento elettroforetico è utilizzata una cella Mini Trans-Blot ® (Biorad) e una differenza di potenziale costante di 120 V. Il trasferimento viene eseguito per 1h circa in camera fredda a + 4 ^{o}C. Il Transfer Buffer utilizzato è 1X diluito dalla soluzione madre 5X (Tris-base 0,25 M, Glicina 1,92M).

Dopo il trasferimento viene recuperato il filtro in PVDF che viene lavato in TBS Tween (NaCl 8g, TRIS Hcl pH 7.6, Tween-20 0.1%) per 10 minuti in agitazione; quindi si esegue il bloccaggio per 1h a temperatura ambiente: i siti di legame non specifici vengono saturati mediante immersione della membrana in un buffer (5% non-fat dried milk in TBS-Tween) per un'ora a temperatura ambiente

Si eseguono quindi un lavaggio da 15 minuti e 2 lavaggi da 10 minuti in TBS Tween e si procede all'incubazione del filtro con l'anticorpo primario over-night. Il giorno successivo, dopo un'altra serie di lavaggi, si fa l'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi (Amersham) per 1h prima di passare alla fase finale della 'Detection'

Detection: la detection viene eseguita con il sistema di analisi e i reagenti ECL (Enhanced Chemioluminescence, Amersham); il metodo, non radioattivo, utilizza la chemioluminescenza per evidenziare lo specifico antigene immobilizzato con anticorpi marcati mediante HRP (Horseradish Peroxidase), è un metodo sensibile, ad alta risoluzione, veloce, che permette di evidenziare anche piccole quantità di proteine immobilizzate sul filtro dopo trasferimento e che permette lo 'stripping' e il 'reprobing'.
La chemioluminescenza è l'emissione di luce che risulta dalla dissipazione di energia da una sostanza in uno stato eccitato; il metodo più diffuso fa uso del luminolo che viene ossidato, in condizioni alcaline, in presenza di HRP e perossido d'idrogeno; successivamente all'ossidazione il luminolo si trova in uno stato eccitato e quindi decade ad un livello basale attraverso l'emissione di luce. Più precisamente nel metodo ECL l'ossidazione del luminolo da parte della HRP è fatta avvenire in presenza di fenoli; ciò ha l'effetto di incrementare l'emissione di luce di circa 1000 volte e di estendere l'intervallo di tempo in cui avviene l'emissione: la luce prodotta ha un picco dopo 5-20 minuti e decade lentamente con una vita media di circa 60 minuti.
Il massimo di emissione della luce si verifica alla lunghezza d'onda di 428 nm e può essere evidenziata dopo una breve esposizione a film autoradiografici.
La detection viene eseguita mescolando in rapporto 1:1 i reagenti della Amersham (0,25 ml/cm^2 di superficie della membrana) in maniera tale da ricoprire interamente il filtro, per 1 minuto. Quindi si esegue l'autoradiografia mediante pellicole fotografiche (Kodak). All'esposizione della pellicola segue lo sviluppo e il fissaggio. Il segnale che impressiona la lastra fotografica è in corrispondenza del sito di legame dell'anticorpo

secondario, a sua volta legato al primario, specifico per la proteina di interesse e viene identificato mediante il marker di peso molecolare.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA

La citofluorimetria è una metodica che consente la misurazione delle caratteristiche fisiche e/o chimiche di particelle microscopiche. Il principio su cui si fonda l'analisi è quello della focalizzazione idrodinamica delle particelle : nella cella di misura di un citofluorimetro a flusso si realizza un flusso laminare concentrico di liquidi in cui il più esterno (il liquido di trascinamento) trasporta all'interno una sottile vena fluida di campione. In questo modo le cellule sono forzate ad allinearsi e ad attraversare individualmente un punto di misura dove interagiscono con il fascio di luce del sistema di eccitazione. Da questa interazione sono generati dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche quali diametro, volume, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna e rugosità di superficie, e dalla presenza di marcatori fluorescenti sulla superficie, nel citoplasma o nel nucleo della cellula.

L'interazione del fascio di luce con la cellula dà luogo a tre fenomeni : light scattering, assorbimento e fluorescenza.

Il light scattering comprende i fenomeni di riflessione, rifrazione e diffrazione della luce. Una cellula colpita da un fascio luminoso emette segnali relativi alle sue caratteristiche fisiche e morfologiche.

Il segnale legato alla diffrazione, il Forward scatter, è funzione del diametro delle cellule analizzate. Il Side scatter è invece il segnale legato ai fenomeni di riflessione e rifrazione a loro volta dipendenti dalla granularità interna, dal rapporto nucleo citoplasma, dalla rugosità di superficie oltre che dal diametro. La combinazione del

Forward scatter e Side scatter dà origine a un diagramma di dispersione denominato Citogramma nel quale è possibile risolvere le popolazioni cellulari in base alle loro caratteristiche fisiche .Il segnale FCS è rilevato mediante un fotodiodo, mentre la misura del SSC richiede un fotomoltiplicatore.

L'altro parametro analizzato, e il più importante, è la fluorescenza ottenuta marcando con opportuni fluorocromi vari componenti cellulari da determinare quantitativamente. Anche in questo caso il sistema di rilevazione è costituito da fotomoltiplicatori. Gli impulsi analogici provenienti dai sensori sono processati da un amplificatore e mandati a un convertitore analogico digitale che li converte nel cosiddetto "quanto" citometrico, che prende il nome di evento, e che rappresenta il segnale rilevato dal computer. Tutti gli eventi relativi all'insieme dei dati misurati si accumulano nei vari canali e vengono a costituire un classico diagramma di distribuzione . Lo strumento FACScan della Becton-Dickinson è dotato di un laser a ioni Argon con una potenza di 15 mW accordato sulla lunghezza d'onda di
488 nm, e di filtri di rilevazione di 538 nm, 585 nm e 633 nm.

- **<u>Misurazione dei livelli di ROS:</u>**

a) <u>Misurazione mediante DCFH-DA</u>: le cellule dopo essere state sottoposte ad un trattamento sono incubate nel loro stesso mezzo con la 2',7'-diclorodiidrofluoresceina di acetato (DCFH-DA) 5 μM per 20 minuti e sono quindi analizzate al citofluorimetro. Il probe ha la caratteristica di penetrare nelle cellule e di rimanervi a seguito dell'azione di esterasi cellulari che portano a termine una deacetilazione della molecola. Nel citosol dove si localizza la DCFH può essere ossidata a 2',7'-diclorofluoresceina (DCF) per opera di

ossidanti; specie radicaliche molto attive nell'ossidazione che richiedono l'intervento di perossidasi, come la glutatione per ossidasi e la catalasi, sono l'H_2O_2 e i perossinitriti (Ischiropoulos H, Gow A et al.,1999). La DCF è fluorescente se eccitata con il laser del citofluorimetro a 488 nm ed emette un segnale rilevabile a 538 nm (FL1-H).

- **Analisi di Bcl2:**

Le cellule sono lavate in PBS e fissate con paraformaldeide al 4% per 18 minuti a temperatura ambiente; sono quindi centrifugate a 1500 rpm per 7 min e lavate 2 volte in PBS. Dopo permeabilizzazione in EtOH al 70% si eseguono due lavaggi in PBS. Quindi si procede incubando con l'anticorpo primario monoclinale di topo anti Bcl-2 umano (Calbiochem) 1:10 in BSA allo 0,5% e si lascia agire per 1h in ghiaccio ed in agitazione. Dopo aver effettuato altri due lavaggi in PBS si va ad incubare con l'anticorpo secondario goat-FITC anti-topo (Calbiochem) 1:200 in BSA allo 0,5% e si lascia agire in ghiaccio e in agitazione per 15 min. Infine si effettuano atri tre lavaggi in PBS e le cellule sono analizzate al citofluorimetro utilizzando il filtro di rivelazione a 538 nm (FL1-H).

- **Analisi di LMP1:**

Le cellule sono lavate in PBS e fissate con paraformaldeide al 4% per 18 minuti a temperatura ambiente. Quindi vengono centrifugate a 1200 rpm per 7 min, lavate in PBS due volte e incubate per 15 minuti a $+4^{o}$ C nella soluzione di bloccaggio PTA (0,2% Tween, 1% BSA, PBS). Dopo un lavaggio in PTA le cellule sono incubate con l'anticorpo primario 1:300 in PTA e lasciate per 1 h a 25^{o} C in agitazione; infine sono lavate altre tre volte in PTA.

Si procede successivamente all'incubazione con l'anticorpo secondario 1:200 in PTA per 30 minuti al buio: dopo tre lavaggi le cellule sono risospese in PBS ed analizzate al citofluorimetro a 538 nm (FL1-H).

- **STUDIO DELL'ATTIVITA' LIPOSSIGENASICA : ANALISI DELLA PRODUZIONE DI HETE MEDIANTE HPLC**

Considerato che le nostre linee cellulari esprimono le LOX, e soprattutto la 5-LOX, di particolare rilievo è sapere se le lipossigesi sono effettivamente attive nel nostro sistema cellulare; l'attività lipossigenasica viene, in genere, valutata misurando la produzione dei metaboliti HETE e nel caso della 5-LOX anche mediante la produzione di LTB4 (Gilabert et al., 2002).

Le misurazioni sono solitamente fatte mediante HPLC, su estratti cellulari che vengono saggiati per la produzione degli HETE dopo stimolazione con acido arachidonico, calcio e ATP; anche in queste condizioni sono stati di solito ottenuti picchi cromatografici di scarsa entità (Steinhilber et al., 1989).

Dalle linee cellulari BL41 ed E2R, dopo omogenizzazione per sonicazione di circa 10 $X10^6$cellule, in assenza di stimolazione, è stata estratta la frazione lipidica; in particolare, dopo sonicazione in PBS, i campioni (1ml) sono stati applicati ad una colonna di estrazione in fase solida C-18 (octadecyl reversed–phase column-Supelco) che viene prima condizionata con 1 ml di MeOH e lavata con con 2 ml di H_2O.

Dopo l'applicazione del campione alla colonna, sono eseguiti due lavaggi con 1 ml di H2O e due lavaggi con 1 ml di MeOH al 25%, quindi si eluisce il campione con 0,5 ml di MeOH puro. La frazione lipidica così separata viene portata a secco, diluita in 100 µl di MeOH e conservata a -80^{o}C; 20 µl di questa diluizione vengono iniettati per l'analisi

in HPLC che viene effettuata con il metodo Gilson utilizzando una colonna C18 Supelcosil 5 µm (150 mm X 4,6 mm I.D.); la fase mobile è MeOH/H2O/acido trifluoracetico (65/35/0,007) e la velocità di flusso di 1ml/min (Jakobsson et al., 1991).

I picchi vengono identificati mediante la spettrofotometria UV (230-270 nm).

Alternativamente l'estrazione della frazione lipidica può essere eseguita utilizzando dei solventi organici e cioè una miscela di esano ed etil-acetato 1:1; 2 ml di tale miscela sono aggiunti alla sospensione cellulare e dopo una vigorosa agitazione i campioni sono centrifugati a 1800 g per 10 minuti a 4^{o}C. La frazione organica superiore viene conservata mentre la frazione acquosa viene sottoposta ad altri due cicli di estrazione.

Infine i grassi sono portati a secco e conservati a -80^{o}C.

In realtà, con i campioni ottenuti dalle nostre cellule non stati raggiunti risultati soddisfacenti: è stato rilevato un segnale solo per gli standard corrispondenti al 5-HETE, al 12-HETE ed al 15-HETE (Fig.1) ma non è stato possibile rilevare la produzione di HETE in vivo .

Tale evidenza non costituisce la prova definitiva dell'assenza di attività lipossigenasica; è noto, infatti, dalla letteratura che gli HETE sono prodotti dalle cellule tumorali a concentrazioni estremamente basse e che tali valori sono quelli effettivamente utili per mediare un effetto biologico.

Quindi per meglio comprendere il ruolo del metabolismo dell'acido arachidonico nel cancro e l'attività delle LOX nelle cellule tumorali in coltura è necessario sviluppare dei metodi di analisi più sensibili rispetto al tradizionale metodo della HPLC-UV.

Sono stati sviluppati metodi di rilevazione, accoppiati ad HPLC, molto più sensibili mediante fluorescenza (Yue et al., 2004) o metodi di gas-cromatografia accoppiati a spettrometria di massa (GC/MS) (Lehmann et al., 1995); essi richiedono tempi

sperimentali lunghi dovuti alle reazioni di derivatizzazione; una metodica molto più veloce e sensibile è invece rappresentata dalla LC/MS/MS (High Performance Liquid Chromatography/ Electrospray Ionization Mass Spectrometry) che è già stata messa in pratica per misurare la produzione di HETE da linee cellulari tumorali e gli effetti inibitori di composti sull'attività di enzimi del metabolismo dell'acido arachidonico come le ciclossigenasi (Kempen et al., 2001).

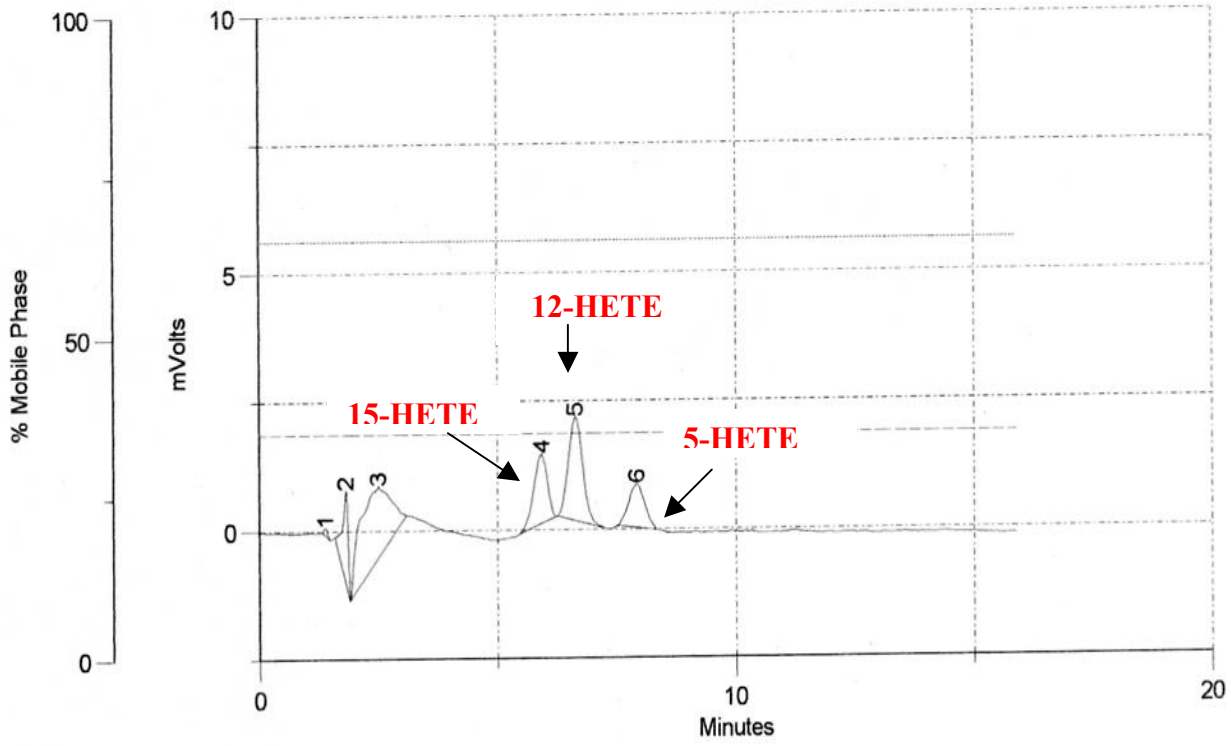


Figura 12: Analisi HPLC accoppiata ad UV degli standard 15-HETE, 12-HETE e 5-HETE mediante il metodo Gilson; vengono iniettate concentrazioni variabili tra le 300 e 600 picomoli delle varie isoforme di HETE che vengono separate mediante una colonna C18 Supelcosil 5 µm (150 mm X 4,6 mm I.D.) in isocratica, mediante la fase mobile e MeOH/H2O/acido trifluoracetico (65/35/0,007) con una velocità di flusso di 1ml/min (Jakobsson et al., 1991). I vari metaboliti hanno i seguenti tempi di eluizione: 15-HETE 5,91 minuti; 12-HETE 6,64 minuti; 5-HETE 7,93 minuti. I picchi vengono identificati mediante la spettrofotometria UV (230-270 nm).

RISULTATI

- **LINEE DI LINFOMA DI BURKITT EBV + MOSTRANO UNA AUMENTATA RESISTENZA ALL'APOPTOSI: OVER-ESPRESSIONE DI BCL-2 IN ASSENZA DI LMP1**

Le linee cellulari di linfoma di Burkitt utilizzate hanno la caratteristica di essere differentemente sensibili all'induzione di apoptosi: in particolare la linea parentale BL41 (EBV-) è quella più sensibile rispetto alle linee cellulari convertite con il virus di Epstein Barr. Tra queste ultime i vari cloni isogenici HS1, E2b ed E2R hanno livelli di resistenza progressivamente crescenti come è possibile osservare dai grafici della Fig.1. La differente risposta cellulare all'induzione di apoptosi può essere messa in luce utilizzando vari induttori che agiscono con differenti meccanismi: la valinomicina è uno iononoforo del potassio; la puromicina inibisce la sintesi proteica; il perossido di idrogeno causa stress ossidativo; è stata inoltre considerata la risposta cellulare in condizioni di deprivazione di siero (Fig.1a); HS1 è il clone poco più resistente rispetto a BL41, E2R è il clone con il più alto grado di resistenza, mentre E2b ha un comportamento intermedio tra HS1 ed E2R. L'elevata resistenza all'apoptosi della linea cellulare E2R è stata inoltre messa in evidenza dopo trattamento con VP16 (etoposide) e con AMSA (amsacrina), sostanze entrambe usate in protocolli chemioterapeutici.

Considerato che una delle più frequenti alterazioni del macchinario apoptotico riscontrata nei linfomi è la sovra-espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2, tale possibilità è stata valutata anche nel nostro sistema: mediante analisi citofluorimetrica è stato osservato che tutti i cloni EBV positivi hanno più elevati livelli di tale proteina che

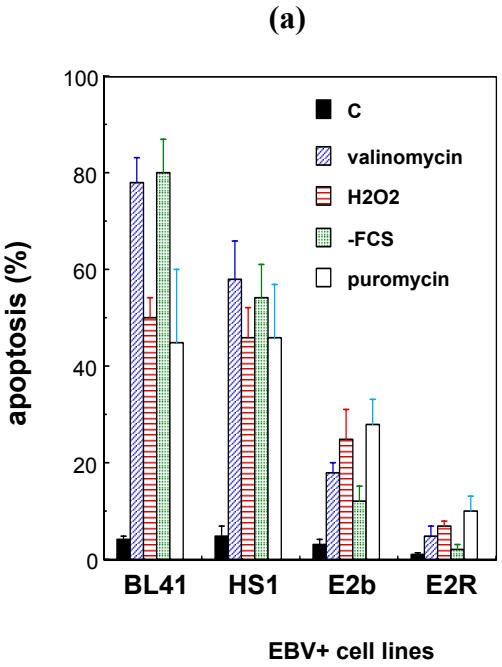
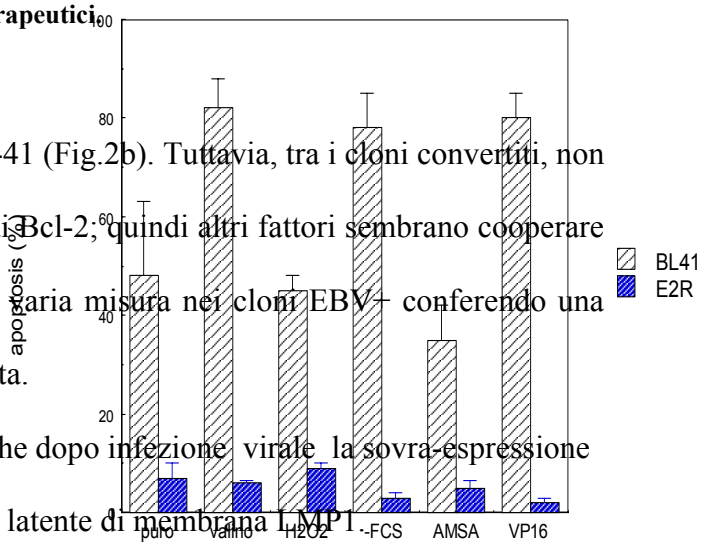


Figura 13: Induzione differenziale di apoptosi nella linea cellulare di linfoma di Burkitt BL41, sensibile all'apoptosi, rispetto ai cloni cellulari da questa derivanti dopo conversione con il virus di Epstein Barr e denominati HS1, E2b ed E2R; questi ultimi risultano progressivamente più resistenti. In particolare in (a) le cellule sono state trattate con Valinomicina (13ng/ml), H_2O_2 (50 µM), puromicina (3 µg/ml) o mantenute per 24 h in assenza di siero; in (b) è posta a confronto la notevole differenza nella risposta cellulare tra BL41 ed E2R, la linea cellulare con il più elevato grado di resistenza, prendendo in considerazione anche altri induttori come VP16 (100 µM) e AMSA (1 µM) utilizzati in protocolli chemioterapeutici.

è invece solo debolmente espressa in BL-41 (Fig.2b). Tuttavia, tra i cloni convertiti, non ci sono sostanziali differenze nei livelli di Bcl-2; quindi altri fattori sembrano cooperare con questa proteina antiapoptotica ed in varia misura nei cloni EBV+ conferendo una resistenza alla morte cellulare differenziata.



E' noto, in altri sistemi cellulari EBV+, che dopo infezione virale la sovra-espressione di Bcl-2 è sotto il controllo della proteina latente di membrana LMP1.

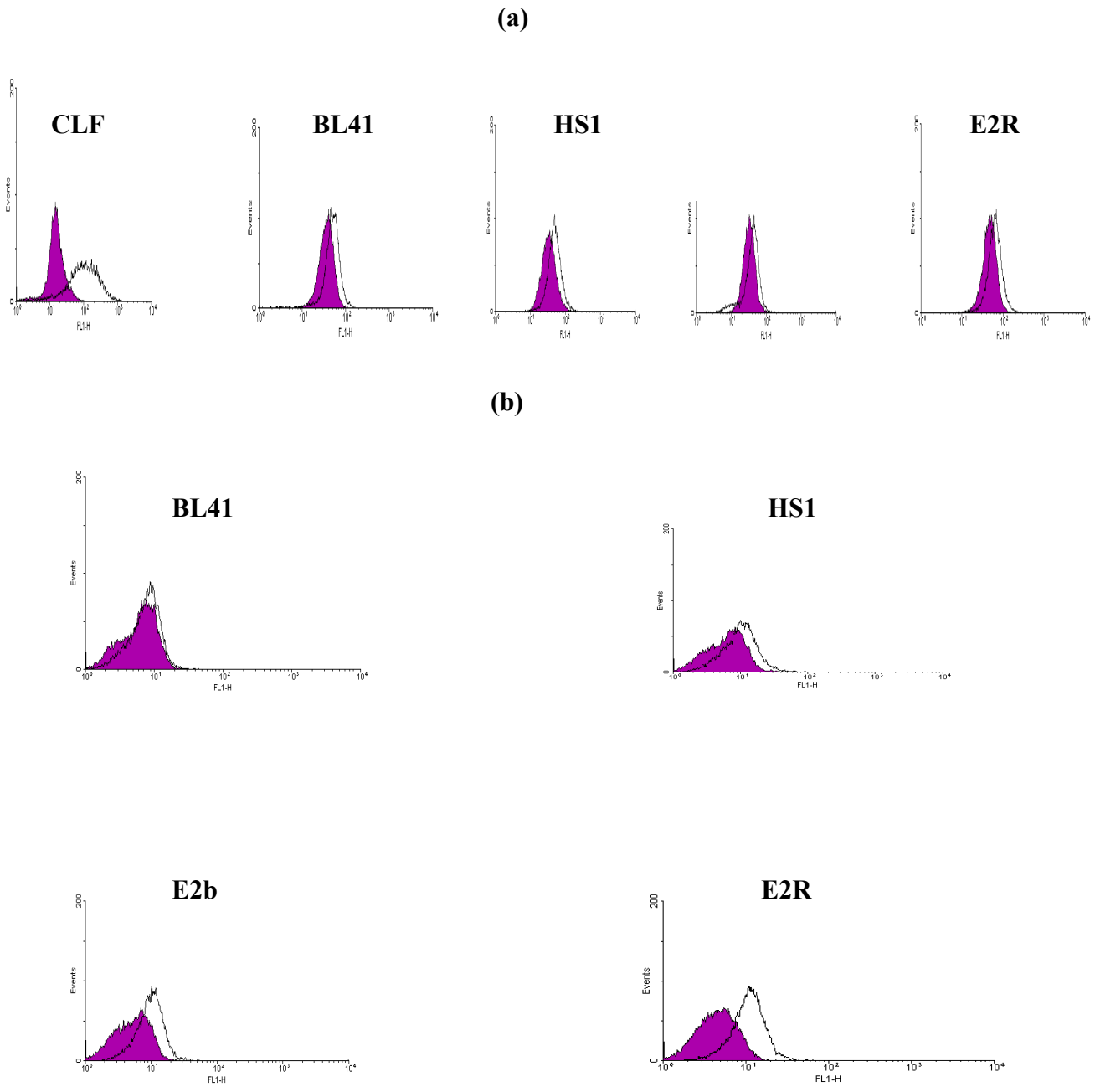


Figura 14: Analisi citofluorimetrica: (a) studio dell'espressione della proteina latente di membrana LMP1; la linea cellulare CLF rappresenta un controllo positivo esprimente la proteina di interesse mentre nessuna delle linee di linfoma di Burkitt (BL41, HS1, E2b ed E2R) sembra esprimere in maniera significativa LMP1; (b) studio dell'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2: si può osservare una sovra-espressione della proteina nei cloni cellulari EBV positivi HS1, E2b ed E2R ma non nella linea parentale BL41.

E’stata così valutata, anche nelle nostre linee, la presenza di questo fattore virale utilizzando ancora una volta l’analisi al citofluorimetro; come controllo positivo è stata utilizzata la linea cellulare CLF, che è nota esprimere LMP1. Come è possibile osservare dagli istogrammi della Fig.2a in nessuno dei cloni EBV positivi è presente la proteina di interesse: deve quindi esistere un meccanismo alternativo che controlla la sovra-espressione di Bcl-2 in assenza di LMP1.

- **L’INFEZIONE CON EBV CORRISPONDE AD UN AUMENTO NEI LIVELLI DI PEROSSIDI SPONTANEI DIRETTAMENTE CORRELATO ALLA RESISTENZA**

Interessante è stato notare che dopo infezione virale, i cloni cellulari EBV+ mostrano più alti livelli di perossidi spontanei. L’analisi del livello di perossidi spontanei è stata fatta al citofluorimetro: le cellule vengono diluite alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml e sono incubate con la sonda DCFH-DA (10μM) per 20 minuti; come è possibile osservare dagli istogrammi della Fig.3a BL-41 è la linea caratterizzata dai più bassi livelli di perossidi spontanei seguita da HS1, da E2b ed infine da E2R, linea con i più alti livelli ossidativi. L’assenza di un assorbimento differenziale della sonda DCFHDA tra i cloni è stata controllata mediante la sonda FDA.

Esiste quindi una diretta correlazione tra resistenza all’apoptosi e livelli di perossidi (Fig.3b); la suddetta correlazione è stata in particolare dimostrata trattando le cellule con valinomicina (13 ng/ml) e perossido di idrogeno (50μM) subito dopo la misurazione citofluorimetrica dello stato ossidativo basale e misurando la corrispondente percentuale di cellule apoptotiche mediante analisi morfologica al microscopio.

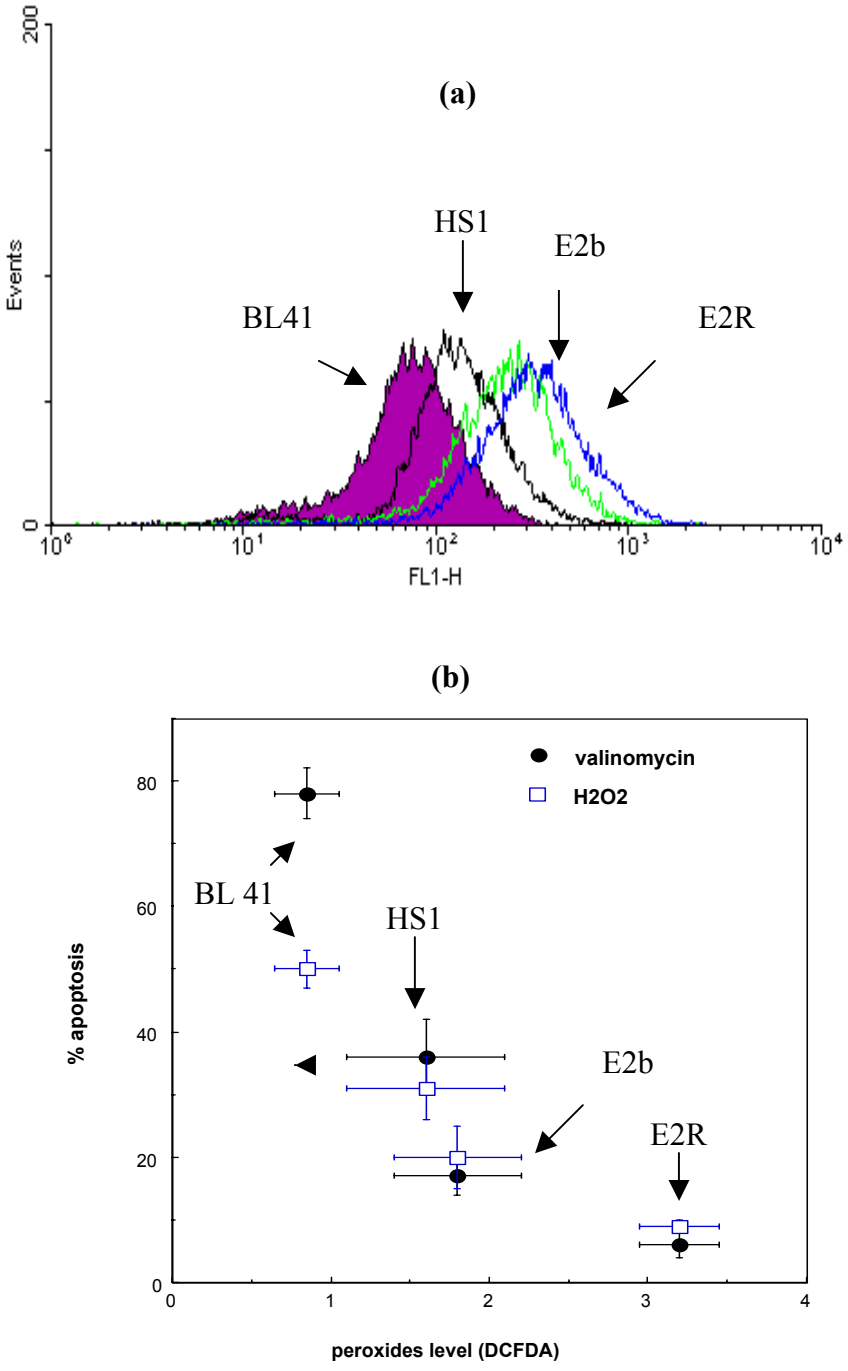


Figura 15: (a) Analisi citofluorimetrica del livello di perossidi spontaneo: le cellule sono diluite alla concentrazione di 5x10 ^{5}cell/ml, trattate con la sonda DCFHDA (10 µM) per 20' ed analizzate al citofluorimetro. Si può osservare un aumento dei livelli ossidativi nelle linee convertite con EBV. (b) Correlazione tra il livello di perossidi endogeno di cellule trattate con valinomocina (13 ng/ml) e perossido di idrogeno (50 µM) e la percentuale di apoptosi indotta dai trattamenti stessi: si può notare che le linee cellulari a livelli ossidativi più alti mostrano una maggiore resistenza ai trattamenti apoptogeni.

- **UN'ATTIVITA' ENZIMATICA LIPOSSIGENASICA CONTRIBUISCE A MANTENERE ELEVATI I LIVELLI DI PEROSSIDI NELLE LINEE EBV+**

Per cercare di comprendere il meccanismo responsabile dell'incremento spontaneo dello stato ossidativo cellulare dopo infezione virale, abbiamo ipotizzato che questo potesse derivare da un sovra-attività di un sistema enzimatico in grado di generare ROS.

Le cellule della linea E2b sono state sottoposte a trattamenti con un inibitore della xantina-ossidasi (allopurinolo100 μM), con inibitori della forma inducibile della ossido-nitrico sintasi (iNOS) (NAME 300 μM, LNMA 300 μM), con inibitori degli enzimi del metabolismo dell'acido arachidonico quali le ciclossigenasi (Diclofenac 1 μM) e le lipossigenasi (CAPE 5 μg/ml e NDGA 50 μM) (Fig. 4a); è stato quindi valutato l'effetto dei vari trattamenti sullo stato ossidativo cellulare ed è stato riscontrato che solo gli inibitori delle lipossigenasi sono in grado di ridurre sensibilmente i livelli di perossidi. Quindi l'analisi sull'inibizione delle LOX è stata estesa anche alle linee cellulari BL41 ed E2R, utilizzando una gamma più ampia di inibitori con diversa specificità per le varie isoforme enzimatiche; sono stati in particolare utilizzati: NDGA (50 μM), un inibitore di varie isoforme di LOX; AA861(50 μM), MK886 (30 μM) e BWA4C (50 μM), inibitori specifici dell'isoforma 5-LOX; e Baicaleina (100 μM), un inibitore specifico dell'isoforma 12-LOX; non sono stati utilizzati inibitori specifici per l'isoforma 15-LOX perchè non disponibili in commercio. Le cellule vengono raccolte dopo due giorni di crescita e sono trattate con i diversi inibitori per tempi brevi (1h e 30 minuti) in maniera tale da eseguire, dopo incubazione con DCFHDA, l'analisi al citofluorimetro in assenza di apoptosi. L'assenza di apoptosi è stata controllata

eseguendo trattamenti in parallelo, sia con DCFHDA sia con FDA; in quest'ultimo caso non è stata riscontrata alcuna diminuzione della fluorescenza.

Si può osservare dalla Fig.4b che sono soprattutto attivi nel ridurre i livelli ossidativi cellulari gli inibitori della 5-LOX mentre non esplica effetti antiossidanti, né sulla linea cellulare BL41 né sulla linea E2R, l'inibitore della isoforma 12-LOX Baicaleina.

Si può notare inoltre che l'azione antiossidante è più marcata sulla linea EBV positiva.

- **ATTIVITA' CITOTOSSICA DEGLI INIBITORI DELLE LOX**

Gli stessi inibitori delle lipossigenasi usati per l'analisi citofluorimetrica sono stati utilizzati in prove di citotossicità; le cellule, sia della linea BL41 che della linea E2R, sono state trattate in parallelo per 6 h con le diverse sostanze; quindi sono state fissate, colorate con DAPI e la percentuale di apoptosi corrispondente è stata misurata mediante analisi morfologica al microscopio a fluorescenza contando la percentuale di cellule con nucleo condensato e frammentato su un totale di 500 cellule.

Si può notare dalla Fig.5a che mentre NDGA (50 μM) e Baicaleina (100 μM) sono tossici soprattutto sulla linea cellulare BL41, ricalcando l'andamento solitamente osservato con altri induttori d'apoptosi, le differenze si appiattiscono con gli inibitori della 5-LOX, BW4C e AA861 (50 μM), che sono in grado di indurre in apoptosi con una certa significatività la linea resistente E2R, capovolgendo la risposta solitamente osservata. Interessante è stato notare che il perossido d'idrogeno e l'analogo della vitamina E denominato Trolox (ad azione antiossidante) esibiscono rispettivamente un effetto protettivo e sensibilizzante sull'apoptosi indotta dall'inibizione della 5-LOX con AA861 (Fig.5b).

E’ inoltre possibile sostenere che l’azione tossica mostrata dagli inibitori delle 5-LOX sembra essere molto specifica e non dovuta al mero effetto antiossidante. Infatti è stato trovato (Fig. 6), che trattando le cellule con Trolox (500 μM), alla diminuzione dei perossidi, prodotta da questa sostanza, non corrisponde un parallelo effetto d’induzione d’apoptosi.

- **STUDIO DI ESPRESSIONE DELLE DIVERSE ISOFORME LIPOSSIGENASICHE**

Considerato che le lipossigenasi sembrano avere un ruolo nel mantenere i livelli ossidativi cellulari e considerata la forte tossicità che gli inibitori della 5-LOX hanno in particolare sulla linea solitamente più resistente all’apoptosi E2R, è sembrato utile portare a termine uno studio di espressione delle diverse isoforme di LOX mediante RT-PCR qualitativa sulle linee cellulari BL41 ed E2R.

Come è possibile osservare dalla Fig.7, la 5-LOX risulta espressa in entrambe le linee cellulari, ma in maggior misura nella linea EBV positiva E2R mentre la 12-LOX è espressa solo da E2R; è inoltre possibile notare che sia BL41 sia E2R esprimono la proteina FLAP (5-lipoxygenase-activating protein) in elevata quantità.

Nella tabella della stessa figura sono schematizzati i risultati raggiunti dagli studi di espressione non solo per la 5-LOX, la 12-LOX e per FLAP, ma anche i risultati ottenuti con altre isoforme di lipossigenasi: si può notare che la 15-LOX1 non risulta espressa dalle nostre linee, mentre la 15-LOX2 è solo debolmente espressa. E’ stata quindi riscontrata un’assenza di espressione delle ciclossigenasi; quest’ultima evidenza conferma i dati citofluorimetrici precedenti dove si è potuto constatare che all’inibizione delle COX non è associata una diminuzione del livello di perossidi cellulari.

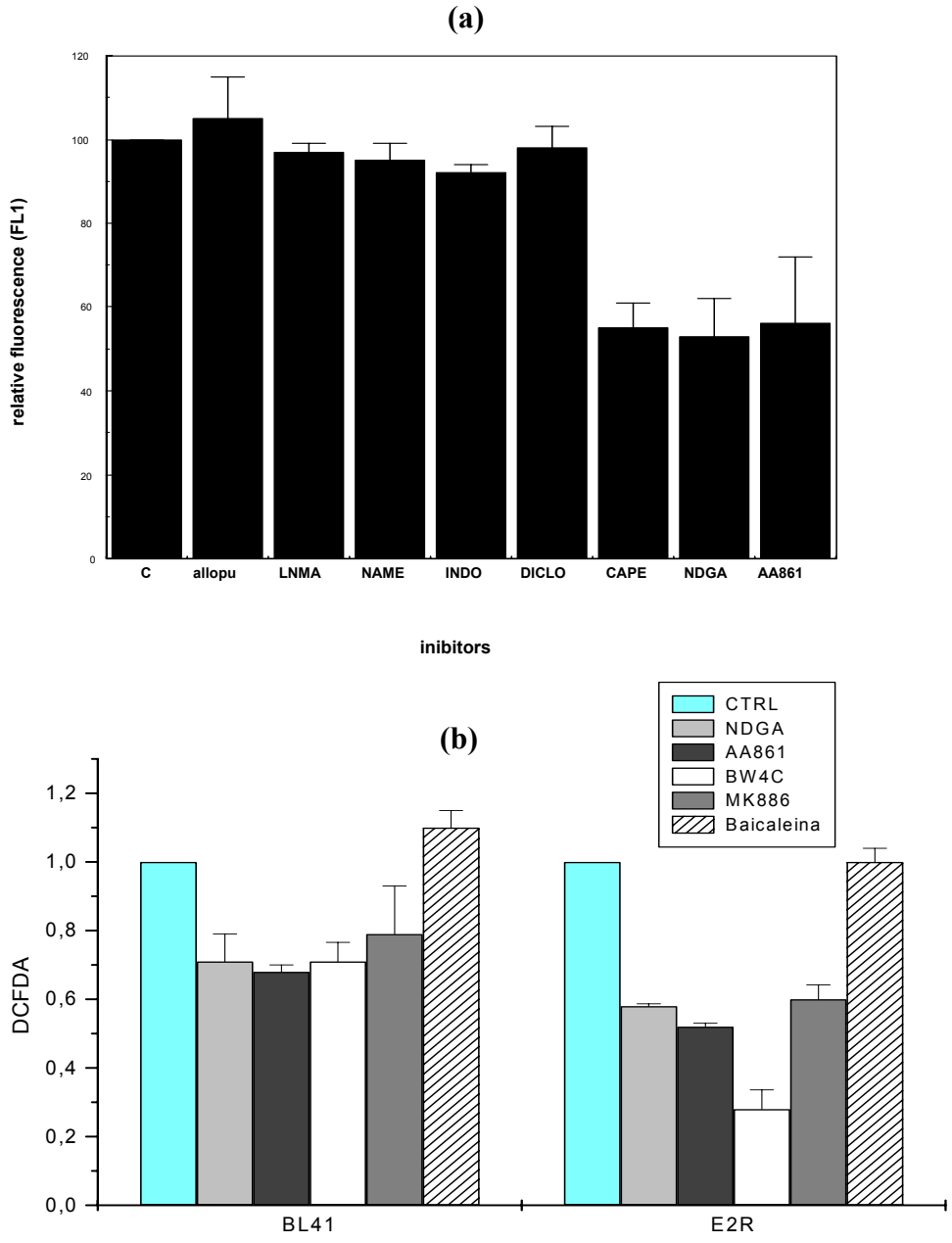


Figura 16: Analisi citofluorimetrica del livello di perossidi intracellulari con DCFHDA: (a) sulla linea cellulare E2b è portato a termine un primo 'screening' per individuare inibitori enzimatici che determinano una diminuzione dello stato ossidativo cellulare. Risultano in particolare attivi gli inibitori delle lipossigenasi CAPE, NDGA e AA861. (b) L'analisi è estesa alle linee cellulari BL41 ed E2R considerando una gamma più ampia di inibitori delle LOX, specifici per le varie isoforme enzimatiche; sono stati usati in particolare gli inibitori BW4C e AA861 dell'isoforma 5-LOX, l'inibitore Baicaleina dell'isoforma 12-LOX ed NDGA (inibitore delle varie isoforme).

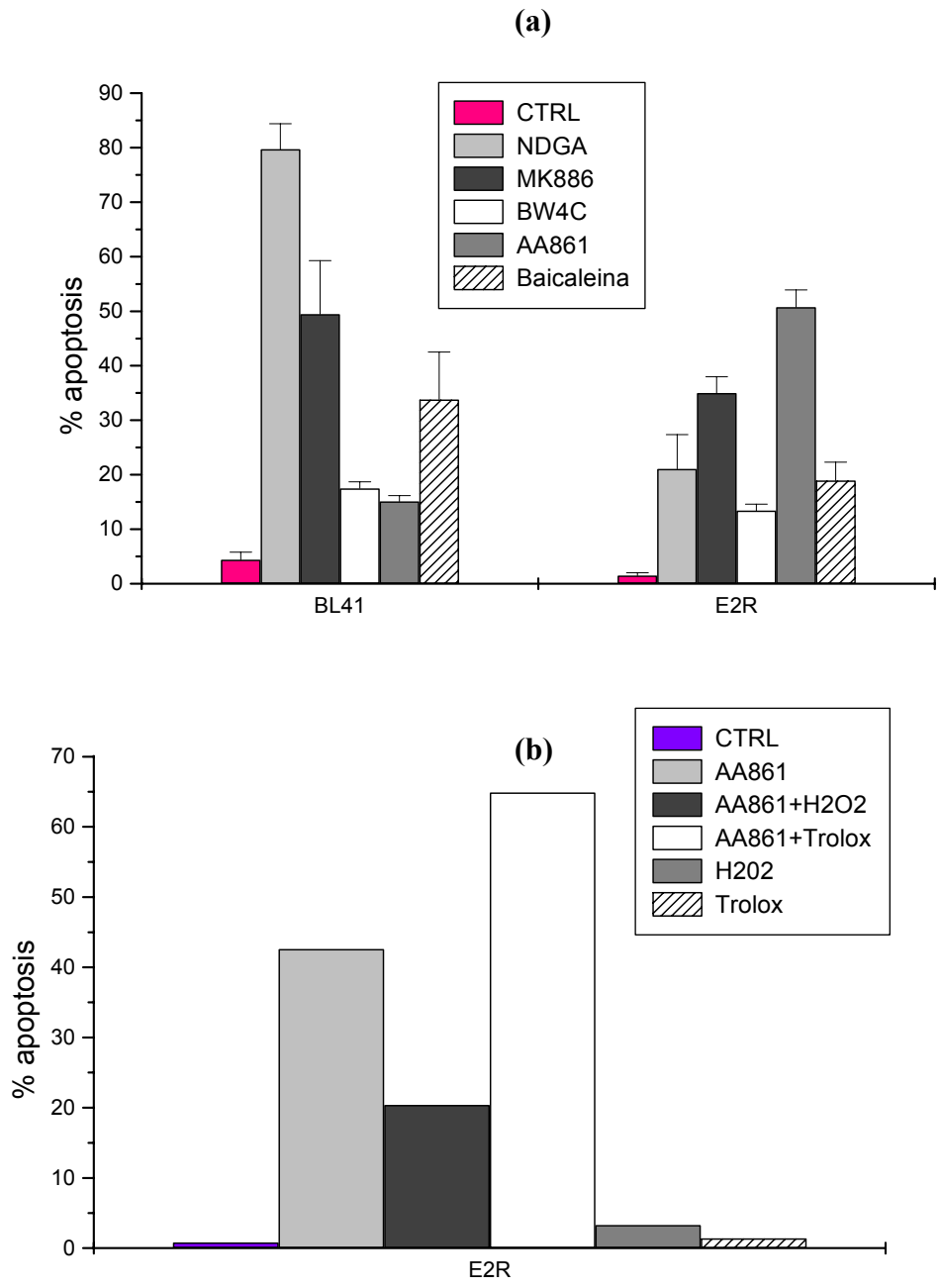


Figura 17: (a) Azione citotossica degli inibitori delle LOX: le cellule della linea BL41 ed E2R vengono trattate con NDGA, AA861, e MK886 (30 µM), BW4C (50 µM) e con Baicaleina (100 µM) per 6 h; si può notare il forte effetto apoptogeno dell'inibitore della 5-LOX AA861 sulla linea resistente E2R rispetto alla linea BL41 solitamente più sensibile ai trattamenti apoptogeni. (b) Effetto protettivo del perossido d'idrogeno (25 µM) e sensibilizzante del Trolox (500 µM) sull'apoptosi indotta dall'inibitore AA861 (30 µM); in quest'ultimo caso le cellule vengono sottoposte ad un co-trattamento per 6 h.

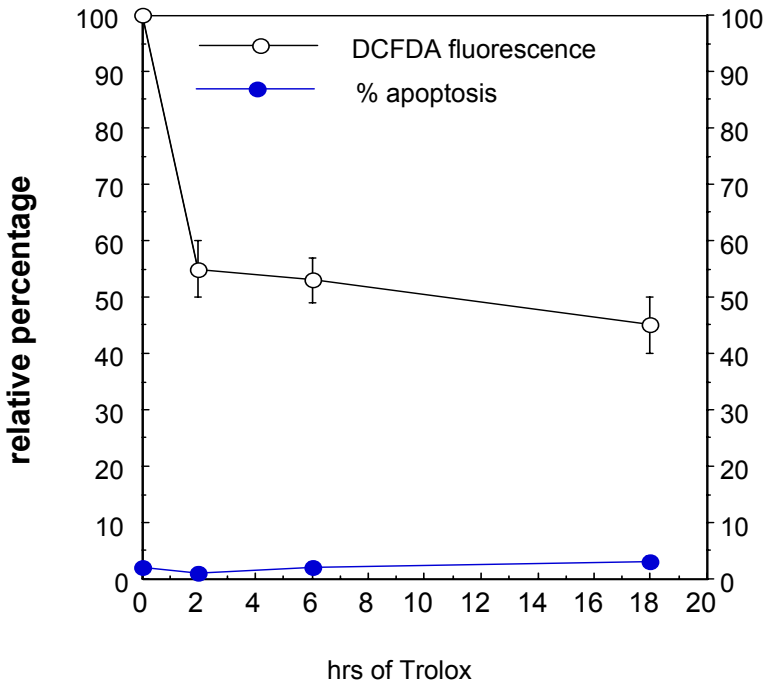
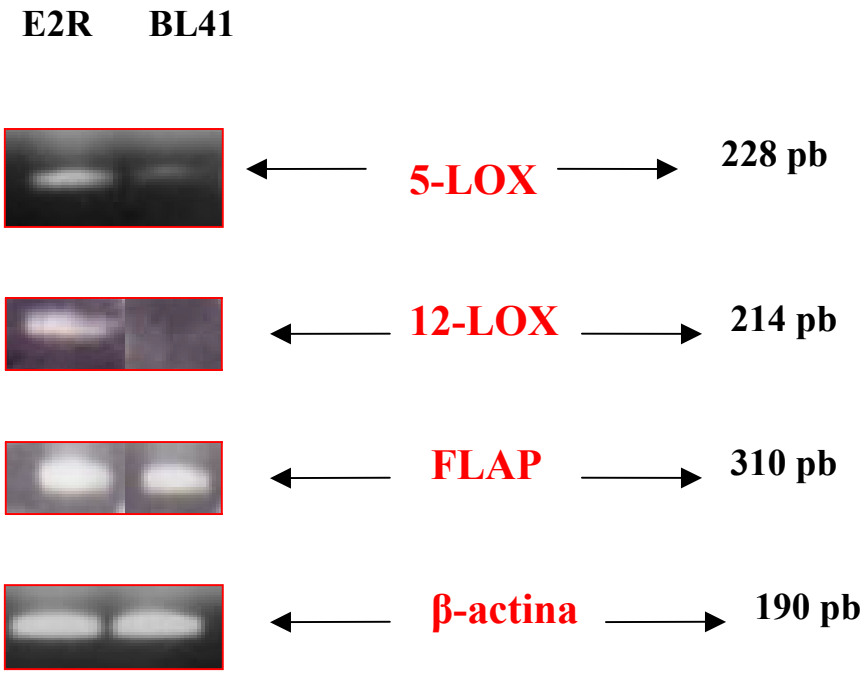


Figura 18: Cellule della linea E2R sono sottoposte in parallelo a prove di tossicità e ad analisi citofluorimetrica del livello di perossidi mediante la sonda DCFHDA dopo trattamento con l'analogo della vitamina E denominato Trolox alla dose di 500 µM per 2 h, 6h e 18h. E' possibile notare che all'azione antiossidante del Trolox, che permane anche dopo 18 h di trattamento, non è associata un'azione citotossica.



Linea cellulare	FLAP	5-S-LOX	12-S-LOX	15-S-LOX-1	15-S LOX 2	COX-1 COX-2
BL 41 EBV- Bassi perossidi sensibile	+++	+	-	-	+ -	-
E2r EBV+ Alti perossidi resistente	+++	++	+	-	+ -	-

Figura 19: Studio comparativo tra le linee BL41 ed E2R mediante RT-PCR qualitativa dell'espressioene delle varie isoforme di lipossigenasi, della proteina FLAP e delle ciclossigenasi.

- **CORRELAZIONE TRA ESPRESSIONE DELLA 5-LOX E LIVELLI DI PEROSSIDI**

Lo studio sull'espressione della 5-LOX è stato quindi esteso a tutti i cloni cellulari; dopo estrazione del RNA e dopo retrotrascrizione si è eseguita una PCR quantitativa in Real-Time mediante Light-Cycler. In particolare l'estrazione del RNA viene fatta subito dopo aver misurato al citofluorimetro i livelli ossidativi basali.

Il grafico della Fig.8 evidenzia la correlazione lineare trovata tra i livelli di espressione della 5-LOX ed i livelli dei perossidi spontanei; infatti la linea cellulare E2R, con più alti livelli ossidativi, è quella che esprime in maggior misura la 5-LOX, mentre la linea BL41, a più bassi livelli ossidativi, è quella che esprime in minor grado l'enzima di interesse; le linee HS1 ed E2b, a livelli ossidativi intermedi, esprimono livelli di 5-LOX intermedi tra quelli di BL41 ed E2R

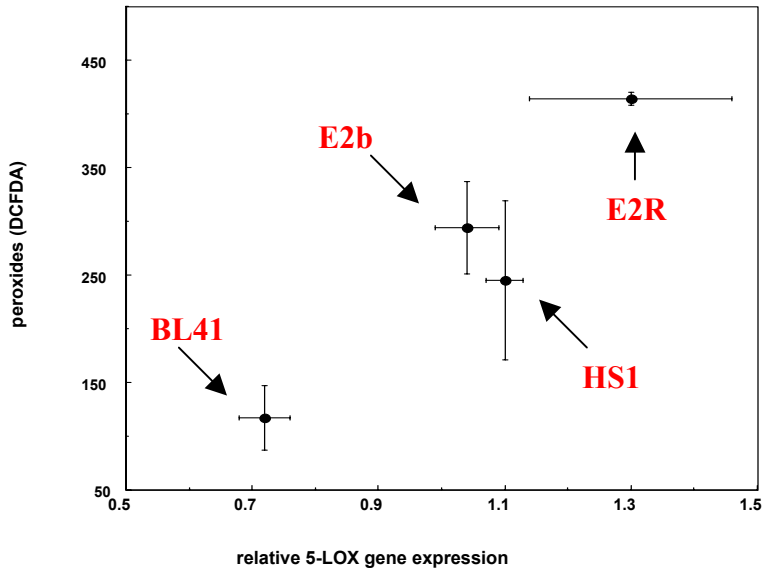


Figura 20: Correlazione tra i livelli di perossidi presenti nelle varie linee (EBV- BL41 e nei cloni EBV+ HS1, E2b ed E2R) e l'espressione dell'isoforma enzimatica 5-LOX valutata mediante RT-PCR quantitativa in Real Time utilizzando un sistema Light Cycler. L'estrazione del RNA viene eseguita subito dopo aver misurato i livelli ossidativi mediante analisi citofluorimetrica.

- **EFFETTI PROTETTIVI DEGLI HETE SULL'APOPTOSI INDOTTA DA INIBIZIONE DELLE LOX**

La conversione dell'acido arachidonico ad opera delle LOX dà origine oltrechè ai ROS, come sottoprodotto di reazione, a leucotrieni e a particolari metaboliti, gli acidi idrossi-eicosatetraenoici (HETE). E' noto in letteratura che attraverso gli HETE sono mediati, nelle cellule tumorali, segnali proliferativi e di sopravvivenza e che tali metaboliti intervengono dell'angiogenesi dei tumori.

Inibire le LOX, ed in particolare la 5-LOX, può indurre apoptosi nelle nostre linee di linfoma proprio a seguito di una diminuzione della produzione degli HETE e dei segnali di sopravvivenza da essi mediati.

E' stato quindi deciso di somministrare alle cellule della linea E2R ma anche a BL41, lo stimolo apoptogeno, corrispondente all'inibizione delle LOX, contemporaneamente agli HETE. Effettivamente questi composti si sono dimostrati in grado di proteggere dalla morte cellulare, ed in particolare l'effetto protettivo è stato osservato solo sulla linea cellulare E2R. Inoltre, è stato interessante constatare che l'azione biologica di protezione dall'apoptosi si riscontra solo a dosi molto basse di HETE (30 nM).

Gli esperimenti di protezione sono stati eseguiti sia sfruttando inibitori generici delle LOX, sia inibitori specifici della 5-LOX e della 12-LOX; in combinazione con ogni inibitore vengono somministrate le diverse isoforme di HETE: il 5-HETE, metabolita della 5-LOX, e il 12-HETE, metabolita della 12-LOX, sono stati somministrati singolarmente o in combinazione.

Le cellule, dopo due giorni di crescita, sono lavate dal terreno, sono diluite alla concentrazione di $5x10^5$ cell/ml e sono pre-trattate con gli HETE; dopo 2h di pre-

trattamento viene aggiunto l'inibitore (NDGA 50 μM, AA861 30μM, BW4C 50 μM) per altre 5 h.

Come è possibile notare dalla Fig.9a, nel proteggere dall'apoptosi causata da NDGA (inibitore generico delle LOX), è attivo soprattutto il 5-HETE e in minor misura il 12-HETE, mentre l'effetto protettivo risulta potenziato dalla somministrazione contemporanea di entrambi i metaboliti.

Un effetto protettivo degli HETE è stato osservato anche dopo inibizione della 12-LOX con Baicaleina (Fig.9b); in questo caso ad esibire un maggior effetto protettivo è però il 12-HETE piuttosto che il 5-HETE; la somministrazione congiunta delle due isoforme esibisce ancora una volta un effetto di potenziamento su quella di ogni singolo metabolita.

Quindi sono stati studiati gli effetti degli HETE verso due inibitori specifici delle 5-LOX e cioè AA861 e BW4C. Anche in questi casi, la somministrazione congiunta del 5-HETE e del 12-HETE ha un effetto protettivo maggiore rispetto ai singoli componenti; ed è soprattutto il 5-HETE, se somministrato singolarmente, ad esibire un effetto protettivo, seguito dal 12-HETE (Fig.10).

E'stato verificato che anche il 15-HETE è in grado di proteggere, solo la linea cellulare E2R, dall'apoptosi indotta da AA861, nonostante l'isoforma 15-LOX2 è solo debolmente espressa ed in maniera paragonabile in BL41 e in E2R (Fig 11).

Il potenziamento degli effetti protettivi dei singoli HETE, quando somministrati in combinazione, indica comunque con chiarezza che la 5-LOX e la 12-LOX cooperano nel mediare segnali di sopravvivenza.

La specificità dell'azione protettiva degli HETE è stata dimostrata considerando gli effetti di un altro composto, derivato dalla 15-LOX1, e cioè il 13-HODE che non è in

grado di salvare le cellule dall'apoptosi (Fig 11); più precisamente il 13-HODE è prodotto dalla 15-LOX1 utilizzando come substrato l'acido linoleico.

Infine, è stato constatato che l'azione protettiva degli HETE risulta specifica verso l'inibizione delle LOX, poiché gli HETE non sono in grado di proteggere dall'apoptosi indotta da altri composti come per esempio la Puromicina.

- **STUDIO DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIATO DAGLI HETE: PPAR, MAPK, PI3K/AKT**

Per cercare di comprendere i processi molecolari in cui intervengono le LOX e per fare chiarezza sul meccanismo con cui gli HETE producono segnali di sopravvivenza nel nostro sistema cellulare, sono state prese in considerazione le due possibili vie recettoriali suggerite in letteratura; è stato infatti supposto che gli HETE possono agire o legando i recettori nucleari detti PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) oppure questi metaboliti diffondono all'esterno delle cellule e possono legare recettori di membrana accoppiati a proteine G; attraverso la via recettoriale di membrana gli HETE possono quindi attivare varie vie di trasduzione come le vie delle MAPK o la via della PI3K/Akt

Al fine di studiare il coinvolgimento dei recettori PPAR nella trasduzione del segnale HETE mediata, è stato fatto dapprima uno studio di espressione mediante RT-PCR delle varie isoforme PPAR α β e γ, ed è stato constatato che gli mRNA per questi recettori sono tutti espressi e nella stessa misura sia nella linea cellulare BL41 sia nella linea E2R (dati non mostrati). E' noto che attraverso i PPARα sono mediati segnali proliferativi e di sopravvivenza mentre attraverso i PPARγ viene indotta apoptosi.

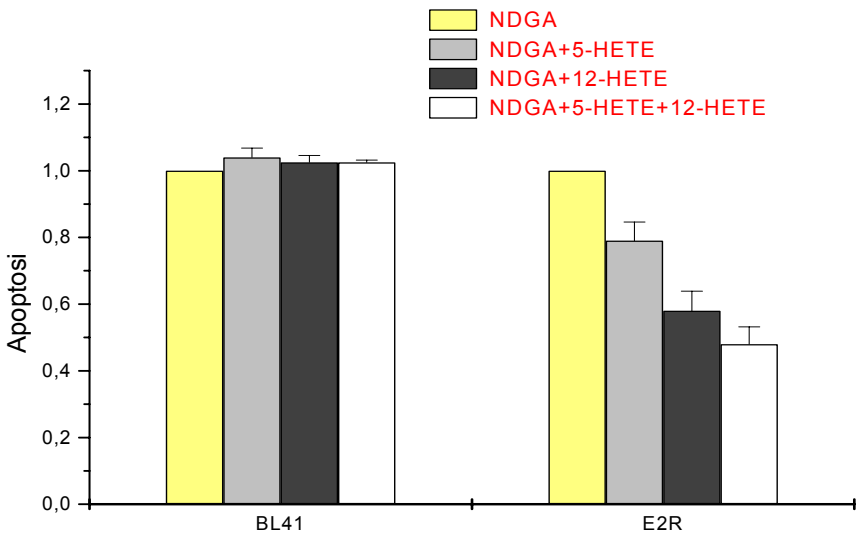
Sono stati quindi utilizzati degli agonisti dei recettori PPARα, a dosi non tossiche, in esperimenti di protezione dall'apoptosi simili a quelli fatti con gli HETE, per vedere se questi composti fossero in grado di salvare dall'apoptosi indotta da inibizione della 5-LOX ripristinando a valle il blocco della segnalazione; in particolare sono stati utilizzati gli agonisti denominati Wy (5 μM) e Clofibrate (10 μM), somministrati alle cellule 2h prima del trattamento con AA861(30 μM) per un tempo totale di trattamento pari a 7h ma non sono stati ottenuti gli effetti sperati (Fig.12a). Tra gli agonisti dei PPARγ sono stati utilizzati il Troglitazone (50 μM) e la $15dPGJ_2$ (5 μM) in trattamenti della durata di 6 h sia sulla linea cellulare BL41 che sulla linea E2R. Interessante è stato notare che sulla linea cellulare resistente E2R la $15dPGJ_2$ esibisce un forte effetto apoptogeno, più che su BL41(Fig 12b).

Per cercare di chiarire se nelle nostre linee cellulari gli HETE mediano segnali attraverso recettori di membrana sono attualmente in corso esperimenti che fanno uso di inibitori specifici di varie vie di trasduzione; in particolare si stanno valutando gli effetti di inibitori delle vie delle MAPK (ERK/MEK, JNK, p38MAPK) e della via della PI3K/Akt.

Considerato che nelle cellule B segnali di sopravvivenza convergono sui fattori trascrizionali della famiglia di c-Rel sono state eseguite prove di citotossicità anche con un inibitore specifico di NF-kB, il Parthenolide.

E' possibile notare dalla Figura 13 che il Parthenolithe (10μM) risulta fortemente tossico e in maniera significativa sulla linea cellulare E2R, che anche la Wortmannina (5 μM) induce in apoptosi la linea resistente E2R mentre gli altri inibitori non sono attivi sia su E2R e neanche su BL41, in quest'utimo caso con l'eccezione del SP 600125 .

(a)



(b)

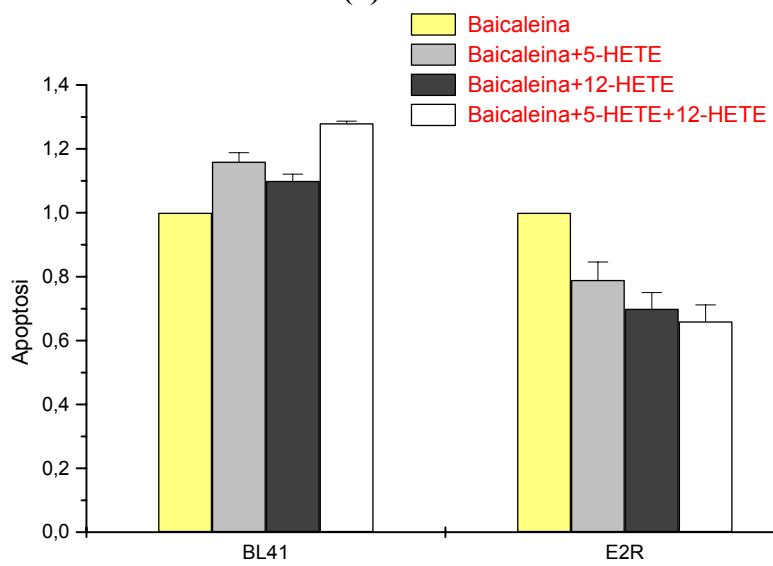
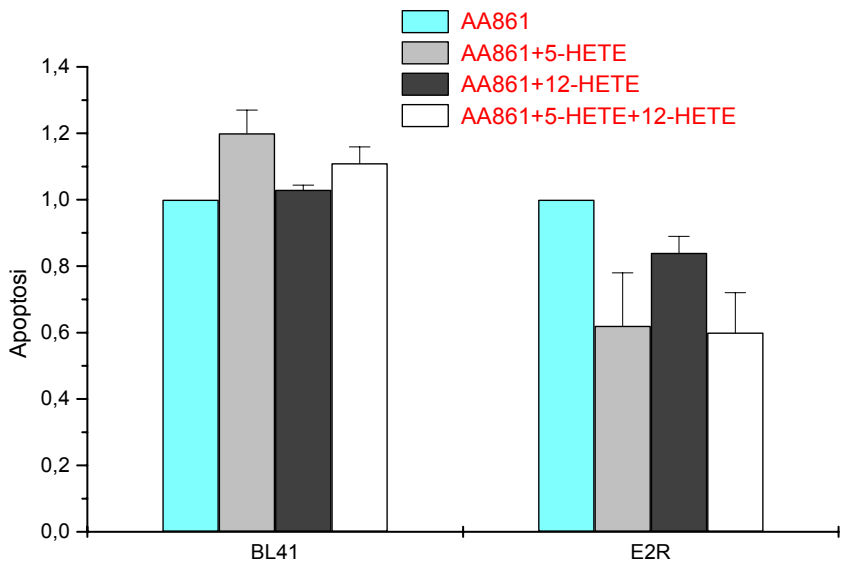


Figura 21: Esperimenti di protezione dall'apoptosi indotta da inibizione delle LOX mediante gli HETE (30 nM) sulle linee cellulari BL41 ed E2R. Mentre non si osserva un effetto protettivo degli HETE sulla linea cellulare BL41 si può notare invece che sulla linea E2R proteggono sia il 5-HETE che i1 12-HETE dall'inibizione con NDGA (50 µM) e con Baicaleina (100 µM); le due isoforme di HETE proteggono inoltre in maggior misura in combinazione tra di loro; (a) il 5-HETE da solo protegge soprattutto contro l'apoptosi indotta da NDGA; (b) il 12-HETE da solo protegge in maggior misura contro l'apoptosi indotta da Baicaleina.

(a)



(b)

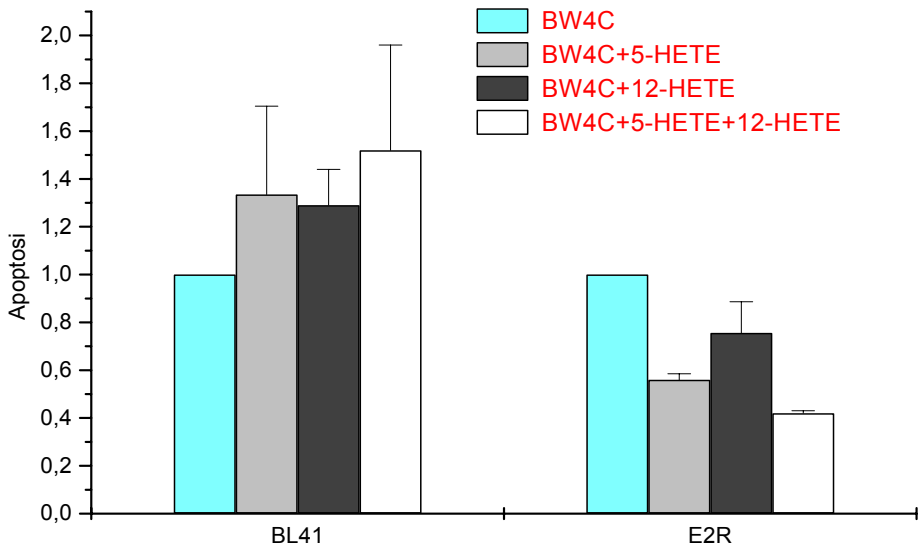


Figura 22: Esperimenti di protezione dall'apoptosi indotta da inibizione delle LOX mediante gli HETE (30 nM) sulle linee cellulari BL41 ed E2R. Mentre non si osserva un effetto protettivo degli HETE sulla linea cellulare BL41 si può notare invece che sulla linea E2R proteggono sia il 5-HETE, (in maggior misura) sia i1 12-HETE dall'inibizione della 5-LOX con (a) AA861 (30 µM) e con (b) BW4C (50 µM); anche in questo caso l'azione protettiva delle due isoforme di HETE risulta potenziata se entrambi i metabolici sono dati in combinazione tra di loro.

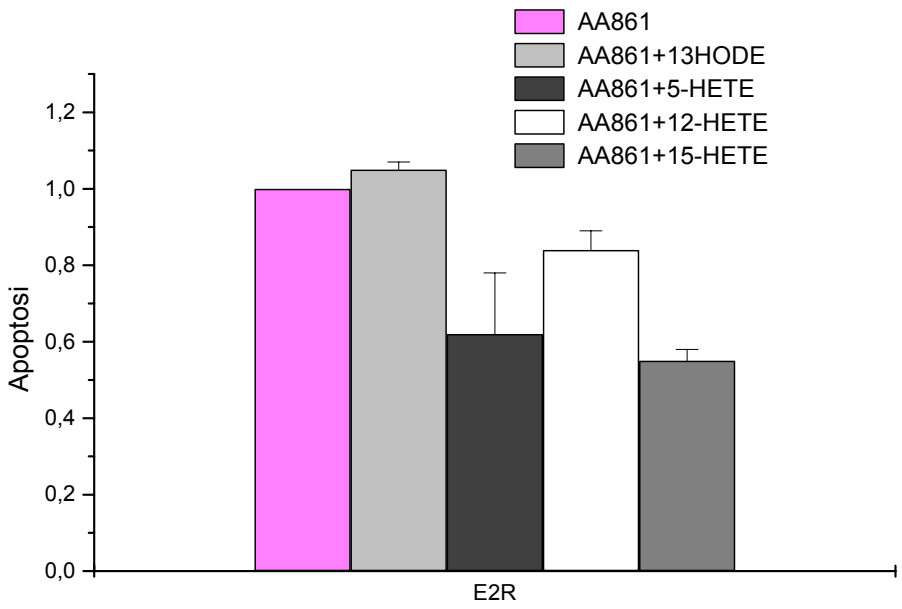
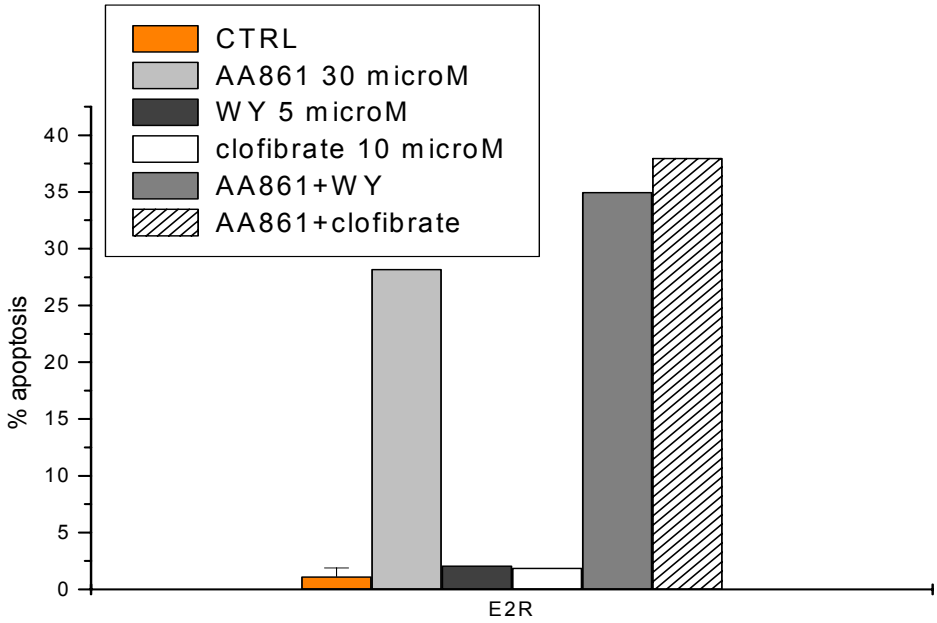


Figura 23: Il grafico mette a confronto l'effetto protettivo delle varie isoforme di HETE sull'apoptosi indotta da inibizione della 5-LOX mediante AA861 (30 µM) e in particolare indica l'effetto specifico di questi metaboliti; infatti un altro composto affine agli HETE e cioè il derivato del metabolismo dell'acido linoleico 13-HODE, prodotto dalla 15-LOX1, non mostra effetti protettivi paragonabili a quelli degli HETE:

(a)



(b)

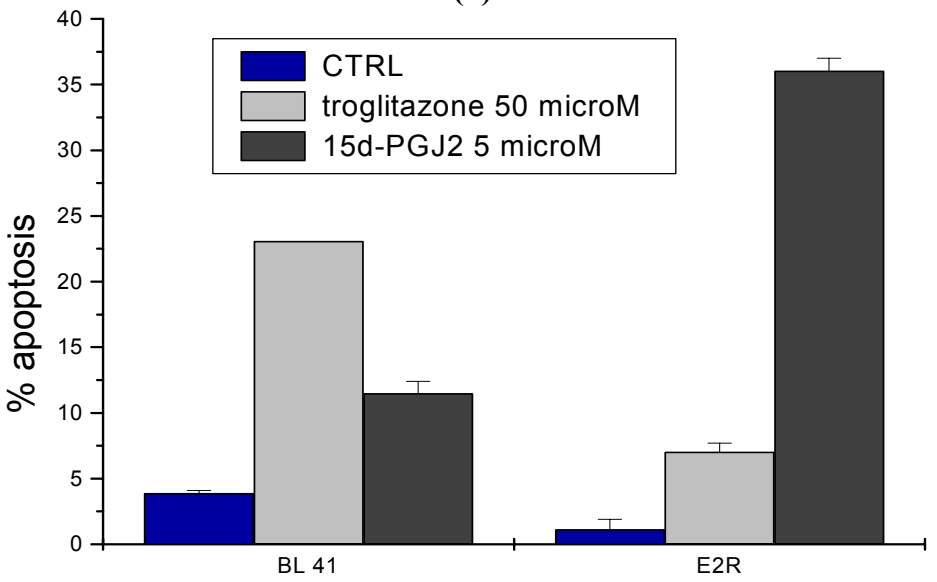


Figura 24: Trattamenti mediante gli agonisti dei PPAR: (a) esperimenti di protezione dall'apoptosi indotta da AA861 sulla linea cellulare E2R con gli agonisti dei PPARα e più precisamente con il Wy (5 µM) e con il Clofibrate (10 µM); le cellule sono incubate per 2h con l'agonista e successivamente trattate con AA861 (30 µM) per un tempo totale di 7 h; (b) le cellule della linea Bl41 ed E2R sono trattate con gli agonisti dei PPARγ denominati Troglitazone (50 µM) e 15dPGJ2 (5 µM) per 6 h.

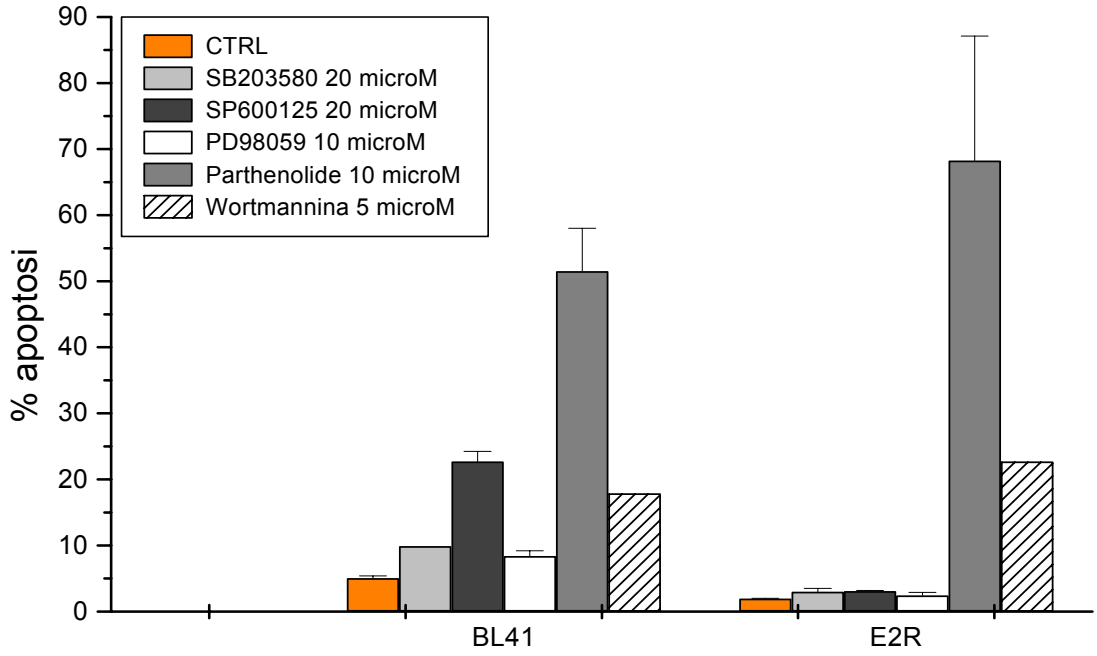


Figura 25: Prove di citossicità sulla linea BL41 ed E2R con inibitori specifici di varie vie di trasduzione del segnale; in particolare le cellule sono state trattate per 6h con l'inibitore della via della p38 MAPK SB 203580, con l'inibitore di JNK SP 600125, con l'inibitore di MEK PD 98059, con l'inibitore di NF-kB Parthenolide e con Wortmannina, inibitore della via della PI3K/Akt. E' possibile notare che inducono in apoptosi la linea cellulare resistente E2R solo la Wortmannina ma soprattutto l'inibitore di NF-kB Parthenolide.

- **STUDIO DELLE VIE APOPTOTICHE INNESCATE DALL'INIBIZIONE DELLA 5-LOX**

Uno scopo centrale della presente ricerca è stato quello di meglio comprendere le alterazioni del macchinario apoptotico, sia del 'signaling' sia della fase esecutiva, che possono essere alla base delle differenti risposte ai vari induttori di morte solitamente osservate tra la linea cellulare parentale BL41 e la linea EBV positiva E2R.

Differenze nella sensibilità/resistenza alla morte cellulare possono dipendere da alterazioni dello stato di attivazione di vie di trasduzione del segnale che favoriscono la sopravvivenza; altre volte differenze sostanziali nella risposta cellulare possono verificarsi in conseguenza di particolari livelli di espressione di proteine direttamente coinvolte nelle vie apoptotiche; vie apoptotiche diverse possono essere innescate attivando o inibendo vie di trasduzione del segnale differenti.

E'gia stato mostrato che la linea cellulare E2R esprime più elevati livelli della proteina antiapoptotica Bcl-2 rispetto a BL41, anche in assenza di espressione della proteina virale LMP1; un meccanismo che nei linfomi è spesso alla base di una over-espressione di Bcl-2 è l'attivazione trascrizionale ad opera dei fattori NF-kB; anche la proteina antiapoptotica X-IAP è sotto il controllo trascrizionale di NF-kB.

Siamo quindi andati a verificare, mediante Western Blotting, l'espressione di X-IAP nelle due linee oggetto del nostro studio per evidenziare eventuali differenze esistenti; abbiamo però riscontrato un espressione paragonabile di tale fattore antiapoptotico sia in BL che in E2R. La proteina XIAP è comunque coinvolta nell'apoptosi indotta da inibizione della 5-LOX, a differenza di Bcl-2 e sembra essere molto importante per conferire resistenza alla morte cellulare: infatti dopo trattamento con AA861, alla dose di 50 μM, per 4-6 h, quando l'apoptosi raggiunge un valore medio pari al 45,2±3,3 si

osserva una sensibile diminuzione della banda relativa ad XIAP (Fig.14a); un simile effetto è scarsamente visibile in BL41(Fig.14c); inoltre è possibile osservare che nelle stesse condizioni E2R non modula Bcl-2 (Fig 14a).

Che l'apoptosi nella linea cellulare E2R, ma anche nella linea BL41, procede attraverso una diminuzione di XIAP è stato dimostrato anche con altri induttori e in particolare con il Parthenolide, che inibisce NF-kB (sulla linea cellulare E2R) (Fig 14a) e con Puromicina, che inibisce la sintesi proteica (sia sulla linea cellulare E2R che su BL4) (Fig. 14b).

E' stato quindi verificato se la diminuzione di XIAP fosse dovuta all'intervento di fattori rilasciati dai mitocondri come Smac e si è studiata la cinetica del rilascio di questo fattore rispetto al rilascio di un altro fattore mitocondriale e cioè il cit c: per Smac e per il cit c è stato così eseguito il frazionamento delle proteine citosoliche e delle proteine mitocondriali.

Come è possibile vedere dalla Fig.15a dopo trattamento con AA861 50 μM nella linea cellulare E2R si osserva il rilascio di Smac già a 4h quando l'apoptosi raggiunge un valore prossimo al 20% e il rilascio di Smac precede il cit c che invece risulta visibile nell'estratto citosolico solo dopo 6h di trattamento, quando l'apoptosi raggiunge un valore prossimo al 50%. Lo stesso andamento si nota sulla linea cellulare BL41 (Fig.15 b) dove il rilascio di Smac è ancora più precoce che in E2R e si osserva già dopo 2 h; comunque il cit c viene rilasciato tardivamente e cioè dopo 6h di trattamento.

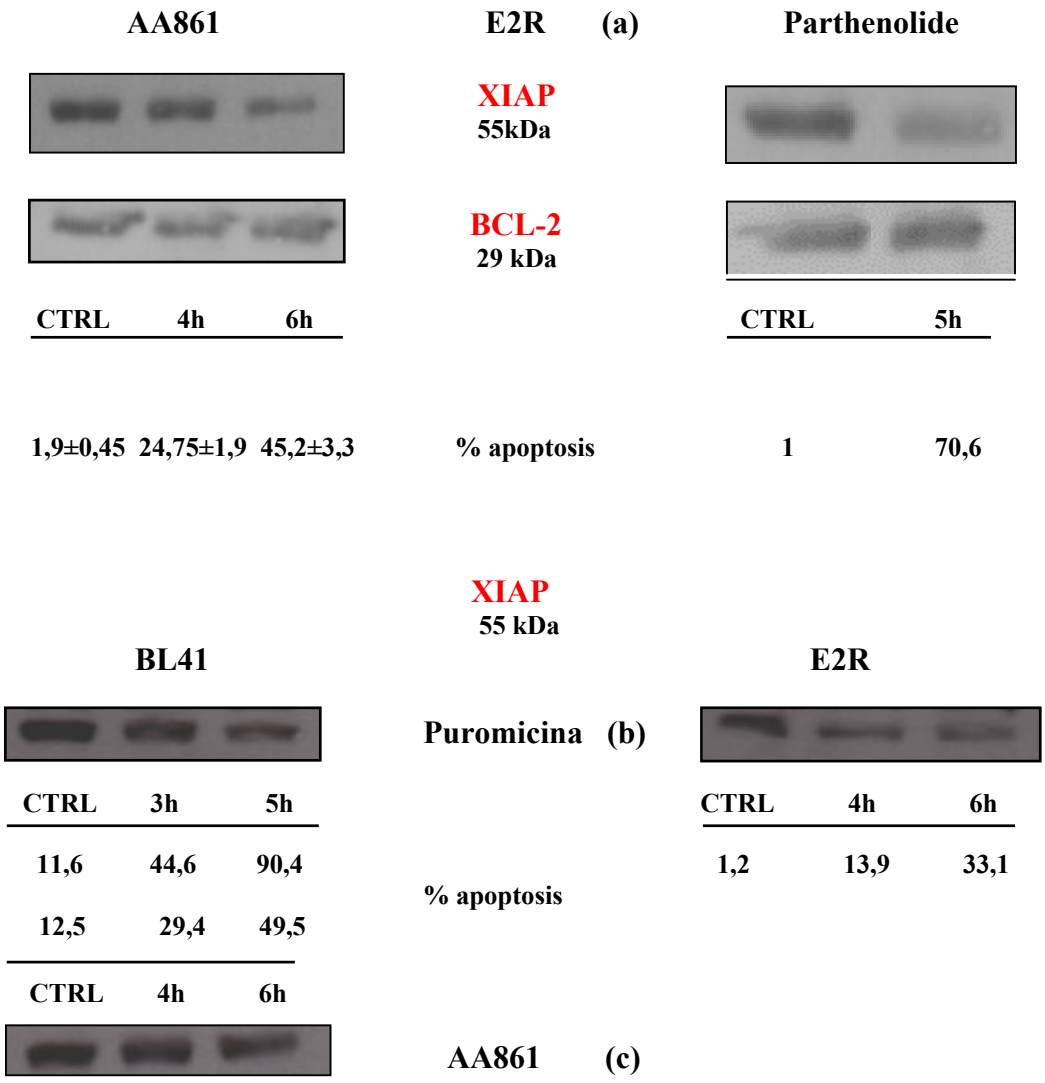


Figura 26: (a) Analisi mediante Western Blotting sulla linea cellulare E2R dell'espressione delle proteine antiapoptotiche Bcl-2 ed XIAP dopo trattamento con AA861 (50 µM) e Parthenolide (10 µM): si può osservare, durante l'apoptosi, una diminuzione di XIAP ma non di Bcl-2. L'espressione di XIAP è stata valutata anche sulla linea cellulare BL41 dopo trattamento con AA861 (50 µM) (c) e su entrambe le linee dopo trattamento con Puromicina 3 µg/ml. La diminuzione di XIAP pur verificandosi anche su BL41 è sempre di minore entità rispetto a quella osser5vata in E2R.

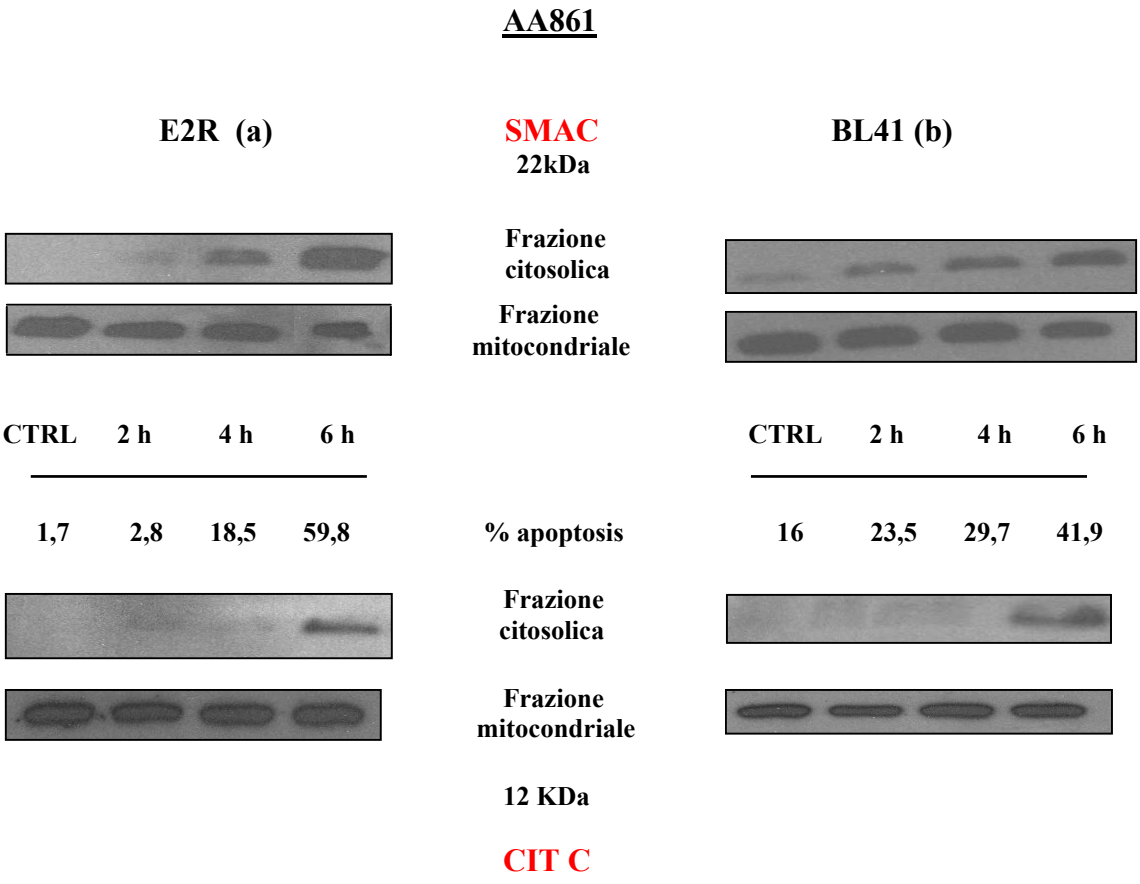


Figura 27: Analisi mediante Western Blotting delle proteine SMAC e Cit c : le cellule della linea BL41 ed E2R sono trattate per i tempi indicati con AA861 50 µM; si può notare la diversa cinetica nel rilascio nel citosol di questi due fattori mitocondriali; in particolare Smac è rilasciato più precocemente e cioè a 2-4 h di trattamento rispetto al Cit c rilasciato solo a 6 h; il rilascio di Smac sembra essere indispensabile perché l'apoptosi proceda.

Che, nella linea cellulare E2R, la fuoriuscita di Smac precede quella del cit c è stato osservato anche con altri induttori di apoptosi come il partenolide e la puromicina (Fig. 16 a e b). E' stato molto interessante trovare, in entrambe le linee BL41 ed E2R, la caspasi 9 costitutivamente attiva già nel controllo; nella linea cellulare E2R, durante il procedere dell'apoptosi indotta da Parthenolide, Puromicina ed AA861 non si verifica una ulteriore attivazione della caspasi 9 e nessun incremento significativo nell'intensità della banda corrispondente al frammento p37 di questa caspasi; ciò è in linea con i

risultati che indicano un ruolo secondario per il citocromo c nell'apoptosi. Una debole diminuzione della banda corrispondente al frammento p47 della pro-caspasi 9 si osserva, sia su E2R sia su BL41, solo dopo trattamento con AA861(Fig16 c).

E' stata inoltre studiata l'attivazione della caspasi 3 dopo trattamento con il nostro inibitore della 5-LOX: come è possibile notare dalla Fig.16c una significativa diminuzione della banda p32 corrispondente alla pro-caspasi 3 si osserva solo su BL41 . Ciò non significa in maniera inequivocabile che la caspasi 3 non è coninvolta nell'apoptosi nella linea EBV+ E2R; per chiarire questo aspetto sono attualmente in corso esperimenti mirati ad evidenziare, sempre mediante Western Blotting, i frammenti proteici che prendono origine dalla scissione della pro-caspasi 3 e cioè i frammenti p12 e p17 che si associano nell'eterodimero attivo.

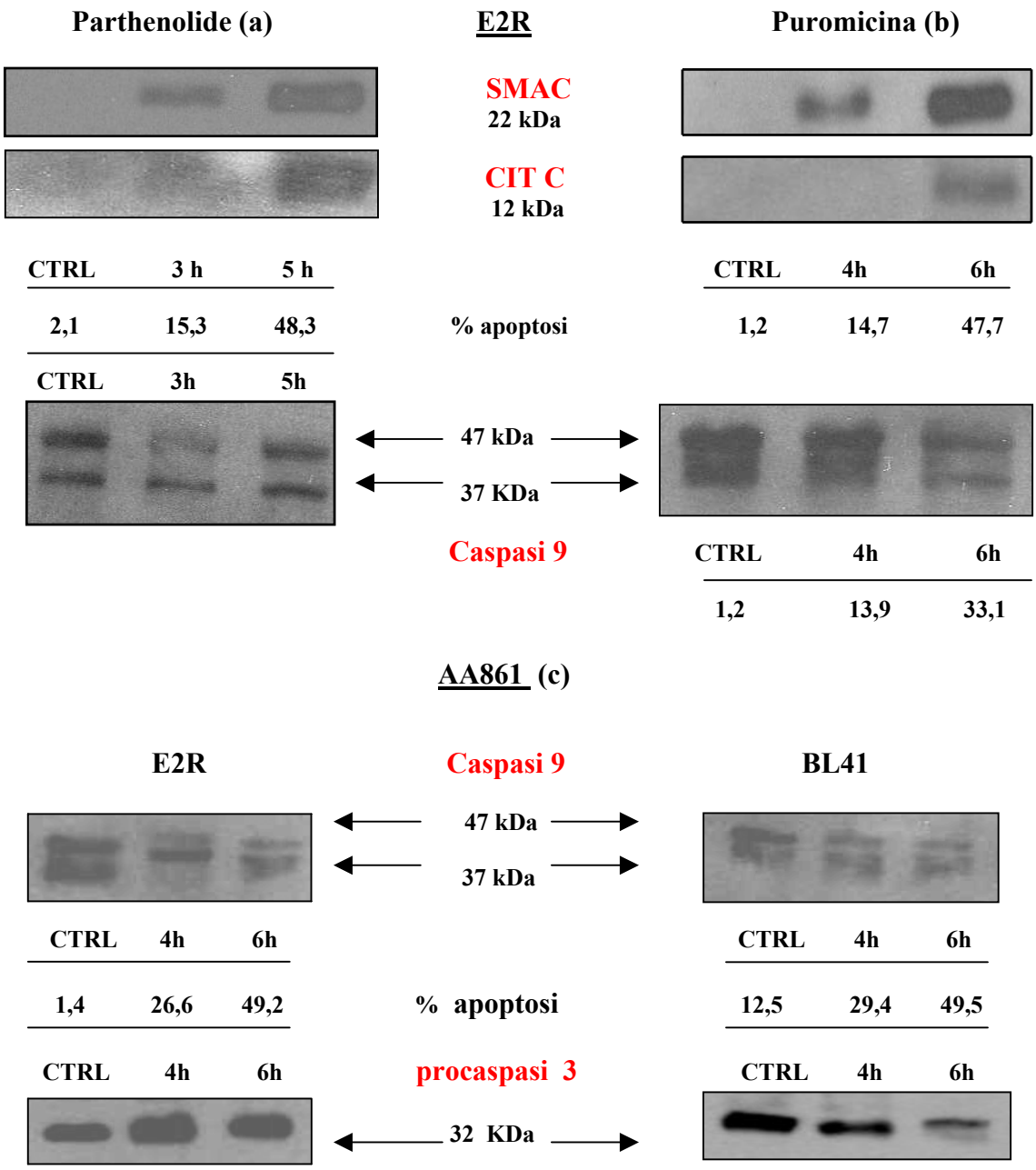


Figura 28: Analisi mediante Western Blotting sulla linea cellulare E2R trattata con Parthenolide 10 µM per 3-5 h (a) e con Puromicina 3 µg/ml per 4-6 h (b); è possibile osservare come la fuoriuscita di Smac preceda il cit c anche con questi induttori alla stessa maniera che con AA861. Inoltre è possibile notare che al rilascio di questi fattori mitocondriali non corrisponde una consistente attivazione della caspasi 9 con Parthenolide (a) con Puromicina (b) e con AA861 (c); invece la caspasi 9 risulta costitutivamente attiva già nel controllo.

Dopo trattamento con AA861 50 µM per 4-6 h si ha invece una significativa diminuzione della banda corrispondente alla pro-caspasi 3 (p32) solo sulla linea cellulare BL41 (c).

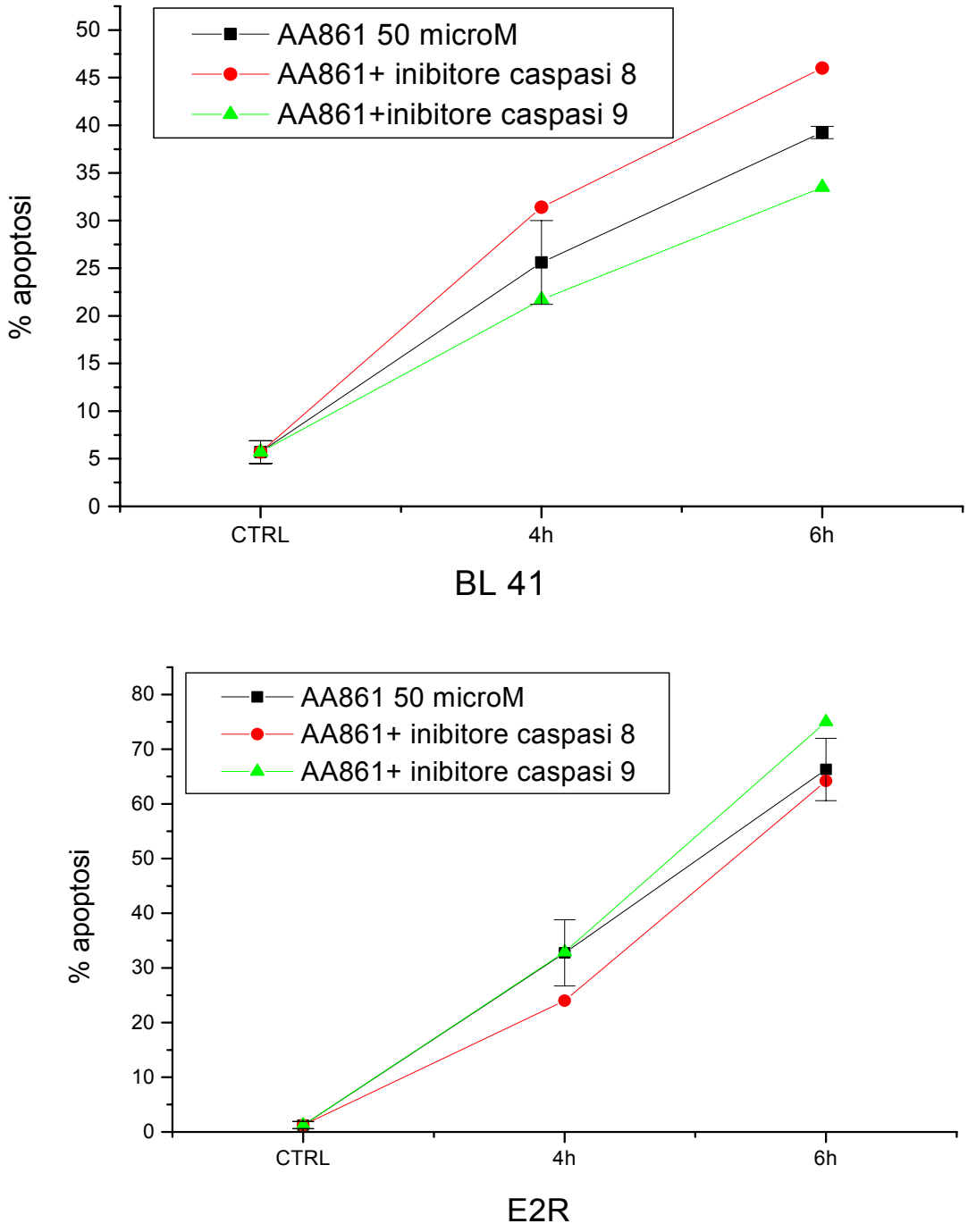


Figura 29: Prove di tossicità con AA861 50 µM somministrato alle linee cellulari BL41 (a) ed E2R (b) sia da solo sia in combinazione con l'inibitore della caspasi 8 (Ac-IETD-CHO) (100 µM) e con l'inibitore della caspasi 9 (z-LEHD-FMK) (50 µM); le cellule sono preincubate con gli inibitori caspasici per 1 h e quindi sottoposte al trattamento con AA861 per i tempi indicati; è possibile notare che nessuno dei due inibitori delle caspasi blocca in maniera significativa l'apoptosi.

Per meglio delineare la via apoptotica innescata dall'inibizione della 5-LOX sia su BL41 che su E2R e il coinvolgimento a vario grado delle caspasi sono state eseguite prove di tossicità con AA861 (50 μM); l'inibitore della 5-LOX è stato somministrato alle cellule sia singolarmente sia in combinazione con inibitori specifici delle caspasi 8 e 9; come è possibile notare dai grafici della Fig.17 nessuno di questi inibitori è in grado di bloccare l'apoptosi indotta da AA861.

Una protezione quasi totale dall'apoptosi nella linea cellulare E2R si osserva invece mediante l'inibitore specifico della caspasi 3 e non solo dopo trattamento con AA861, ma anche dopo trattamento con Puromicina e Parthenolide (Fig 18); è quindi molto probabile che l'esecuzione del programma apoptotico (caspasi dipendente) preveda un forte coinvolgimento di questa caspasi effettrice; è possibile che la caspasi 3 sia già presente in forma attiva nei controlli, così come la caspasi 9, ma bloccata dall'azione di XIAP. Uno stimolo apoptogeno risulterebbe quindi molto tossico sulla linea cellulare E2R se seguito dal rilascio di Smac dai mitocondri; ciò verrebbe a causare una inattivazione e successiva degradazione di XIAP, il rilascio della caspasi 3 attiva (che potrebbe quindi svolgere la proria azione sui substrati bersaglio) e una definitiva attivazione del programma apoptotico.

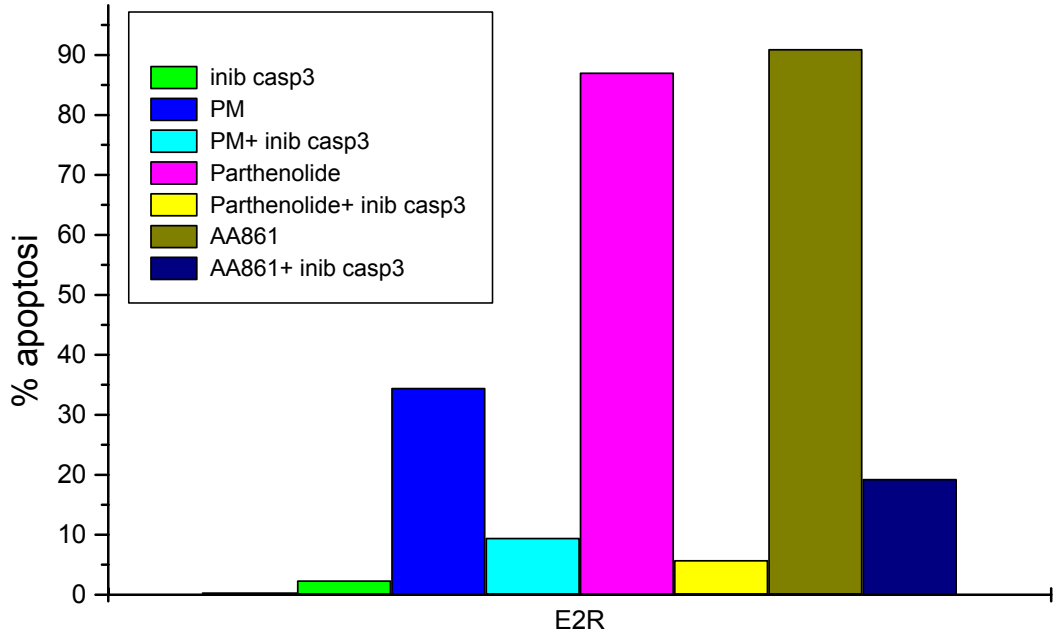


Figura 30: Le cellule della linea E2R sono state prima trattate per 1h con l'inibitore specifico della caspasi 3 (Z-DEVD-FMK) alla dose 50 µM quindi viene aggiunta Puromicina (3 µg/ml) per le successive 4h o Parthenolide (10 µM) o AA861 (50 µM) per altre 5 h. Si può notare la quasi totale protezione che deriva dall'inibizione della caspasi 3 contro l'apoptosi indotta da ognuno di questi composti, agenti con diversi meccanismi d'azione; ciò indica che sulla linea cellulare E2R, quando viene innescata, la morte cellulare è caspasi 3 dipendente.

- **ATTIVITA' CITOTOSSICA in BL-41 vs E2R DI LIGNANI DI NEOSINTESI**

Le nostre linee cellulari BL41 ed E2R sono state inoltre utilizzate per saggiare l'attività citotossica e apoptogena di lignani ariltetralinici naturali e di derivati di sintesi; è noto che i lignani ariltetralinici agiscono come inibitori non redox della 5-LOX in quanto interagiscono con il sito di legame dell'acido arachidonico e questi composti possono rappresentare una nuova classe di agenti terapeutici per la cura delle malattie infiammatorie e del cancro.

Utilizzare le nostre linee isogeniche, con un identico 'background' genetico, ma differentemente sensibili all'apoptosi rappresenta un sistema unico per evidenziare nuove attività biologiche; in particolare la linea cellulare E2R resistente ai vari trattamenti permette di identificare l'effettivo meccanismo d'azione delle molecole oggetto di studio, contro l'indiscriminata sensibilità della linea BL-41 all'induzione di apoptosi. Inoltre sovra-esprimendo la 5-LOX E2R è un ottimo substrato, in vivo, per studiare e saggiare un eventuale azione iniibitrice di queste molecole sul metabolismo dell'acido arachidonico

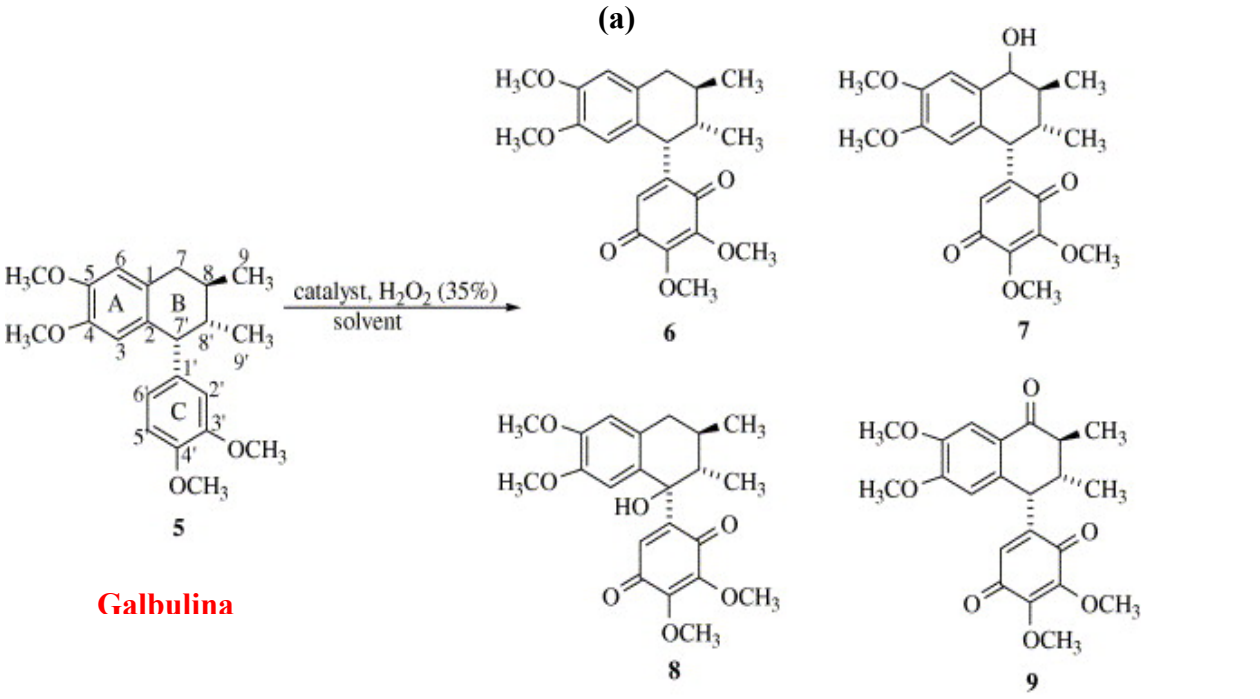
Lignani ariltetralinici altamente ossidati sono stati ottenuti mediante un sistema catalitico eterogeneo che utilizza metil-triossirenio e perossido d'idrogeno come ossidante primario; in particolare dalla galbulina, un lignano ariltetralinico isolato dalla *Galbulimima belgraveana* sono stati ottenuti i derivati benzochinonici della Fig.18a. Questi derivati benzochinonici della galbulina sono stati utilizzati in prove di tossicità sulle nostre linee cellulari BL41 ed E2R (Saladino et al., 2005).

Come è possibile osservare nei grafici della Fig.18b, la galbulina (5) ed i composti 6 ed 8 sono deboli induttori di apoptosi e solo sulla linea cellulare più sensibile BL41.

I derivati 7 e 9, al contrario, sono forti agenti apoptogeni su entrambe le linee cellulari e soprattutto sulla linea cellulare più resistente E2R.

Dato che gli inibitori delle LOX, ed in particolare della 5-LOX hanno un elevato potere antiossidante sulla linea cellulare E2R, corrispondente ad una diminuzione dei perossidi, siamo andati a studiare l'effetto della galbulina e dei suoi derivati benzochinonici sui livelli di DCFHDA con lo stesso protocollo utilizzato per i trattamenti con NDGA e con AA861; cioè le cellule sono raccolte, dopo due giorni di crescita, e trattate direttamente con i composti, tutti alla dose di 50 μM; dopo 1h e 30 minuti viene aggiunta la sonda (20 minuti) e si effettua l'analisi al citofluorimetro.

Come è possibile notare dal grafico della Figura 19 sia la galbulina sia i suoi derivati riducono di circa il 50% i livelli di perossidi in E2R.



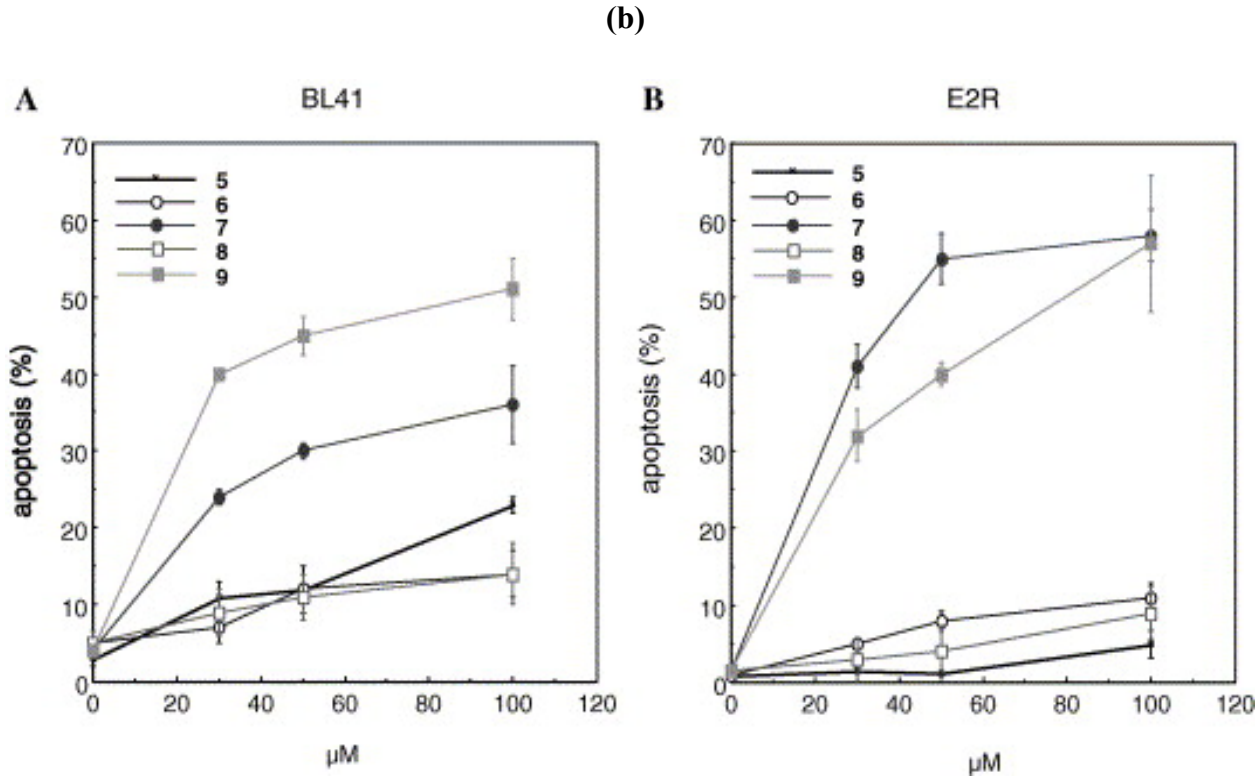


Figura 31: (a): Sintesi di derivati benzochinonici della galbulina mediante un sistema catalitico basato su metiltriossirenio e utizzante come principale ossidante il perossido d'idrogeno. (b): Attività apoptogenica dei derivati benzochinonici della galbulina sulle linee cellulari BL41 (A) ed E2R (B). Le cellule sono trattate con i vari composti alle dosi di 30, 50 e 100μM per 6 h e vengono quindi raccolte e sottoposte all'analisi morfologica.

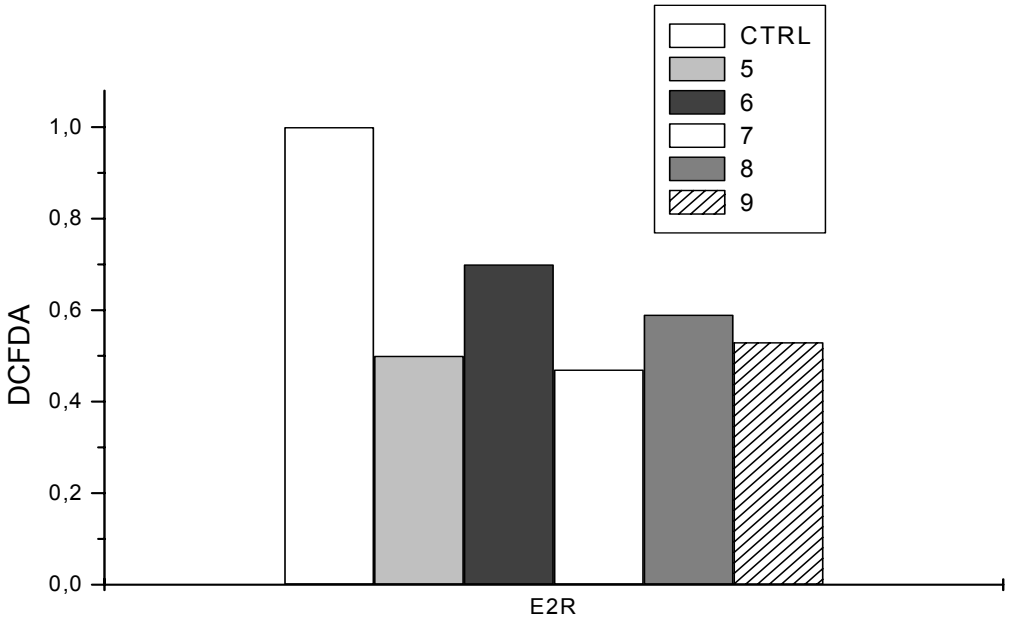


Figura 32: Analisi citofluorimetrica del livello di perossidi dopo trattamento con la galbulina e con i suoi derivati benzochinonici; si può notare come tutti i composti siano dotati di una considerevole attività antiossidante che non è correlata con l'attività citotossica.

DISCUSSIONE

Condizioni di stress ossidativo persistente sono state riscontrate in vari tipi di cancro (Toyokuni et al., 1995) e in diversi sistemi cellulari successivamente ad infezioni virali (Schwarz ,1996).

Le specie reattive dell'ossigeno ed i perossidi partecipano al processo di tumorigenesi: da un lato stimolano la proliferazione e la sopravvivenza attivando numerose vie di trasduzione del segnale e modulando l'espressione genica (Finkel, 2000); dall'altra i ROS danneggiano direttamente il DNA esercitando effetti mutagenici.

Anche nel nostro sistema cellulare di linfoma di Burkitt, dopo infezione con il virus di Epstein Barr, è stato osservato un incremento nel livello spontaneo di perossidi endogeni in confronto al livello basale tipico della linea parentale BL41, cui corrisponde un aumento di instabilità genetica misurato attraverso la formazione di micronuclei (Gualandi et al., 2001).

Il virus di Epstein Barr, appartenente alla famiglia degli herpes virus, è infatti un noto agente trasformante fortemente associato all'insorgenza di tumori come il carcinoma nasofaringeo ed altri carcinomi in situ, nonché alla patogenesi dei linfomi B come il linfoma di Burkitt ed il linfoma di Hodgkin (Thorley-Lawson and Gross, 2004).

EBV interviene nella tumorigenesi non solo causando instabilità cromosomica ma producendo resistenza all'apoptosi nelle cellule infettate attraverso l'azione di numerosi fattori virali (Young and Murray, 2003): tra i più importanti LMP1 che up-regola proteine antiapoptotiche come Bcl-2 ed A20 ed attiva il fattore trascrizionale NF-kB (Dirmeier et al., 2005); LMP1 ed LMP2A stimolano la sopravvivenza cellulare attraverso le vie delle MAPK (Vockerodt et al. 2001, Chen al et al., 2002), e della

PI3K/Akt (Fukuda and Longnecker, 2004; Portis and Longnecker, 2004); piccoli RNA virali non trascritti, detti EBERs agiscono up-regolando Bcl-2 (Komano et al., 1999) e incrementano il potenziale di crescita delle cellule infettate formando complessi inattivanti con le protein chinasi PKR e bloccando la risposta cellulare all'interferone (Yajima et al., 2005; Nambo and Takada, 2002).

- **Controllo dell'apoptosi a livello della segnalazione:**

Anche le nostre linee cellulari HS1, E2b ed E2R risultano più resistenti all'apoptosi a seguito dell'infezione con EBV e se paragonate alla linea parentale BL41; il grado di resistenza all'apoptosi osservato tra i cloni isogenici EBV+ è progressivamente crescente e direttamente correlato allo stato ossidativo cellulare; in particolare la linea BL-41 è la più sensibile all'induzione di apoptosi ed ha bassi livelli di perossidi spontanei, la linea cellulare E2R ha il più alto grado di resistenza ed i più alti livelli ossidativi; HS1 ed E2b esibiscono invece un comportamento intermedio.

Uno dei meccanismi con cui i ROS possono intervenire nella modulazione della sopravvivenza cellulare e della resistenza all'apoptosi è attraverso l'attivazione dei fattori trascrizionali della famiglia di NF-kB (Flohè et al.,1997) che a loro volta regolano l'espressione di fattori antiapoptotici come Bcl-2 (Iqbal et al., 2004) e le proteine della famiglia delle IAP (Munzert et al., 2002).

Nel corso del presente lavoro è stato possibile dimostrare che all'incremento spontaneo dei perossidi, dopo infezione virale, contribuisce in maniera sostanziale l'attività di particolari enzimi: le lipossigenasi.

L'attività di questi enzimi è basalmente accompagnata da una produzione di perossidi, necessaria per mantenere l'atomo di ferro al sito catalitico nella forma funzionale ossidata (Ford-Hutchinson et al, 1994); trattando, sia le cellule della linea BL41, sia i cloni E2b ed E2R, con inibitori della 5-LOX (NDGA, BWA4C, AA861, MK886) è stato possibile evidenziare un forte effetto di riduzione dei livelli ossidativi basali; un simile effetto antiossidante non è mai riscontrato utilizzando inibitori enzimatici diversi, sia all'interno della stessa famiglia lipossigenasica, come l'inibitore della 12-LOX Baicaleina, sia utilizzando inibitori di altri sistemi enzimatici, per esempio della xantina ossidasi, della forma inducibile dell'ossido nitrico sintasi o inibitori delle ciclossigenasi; queste ultime evidenze suggeriscono l'ipotesi di un preponderante contributo dato in particolare dalla 5-LOX alla generazione dello stato ossidativo spontaneo dopo infezione virale.

Le lipossigensi metabolizzano l'acido arachidonico liberato dalle membrane cellulari ad opera della fosfolipasi A2 ed in base alla posizione in cui viene addizionato l'ossigeno all'acido arachidonico, durante il processo catalitico, sono distinte varie isoforme di LOX come la 5-LOX (Rådmark, 2002), la 12-LOX (Yoshimoto and Takahashi, 2002), la 15-LOX1 e la 15-LOX2 (Kuhn et al., 2002).

E'oramai noto che il metabolismo dell'acido arachidonico promuove l'insorgenza e la progressione del cancro (Shureiqi and Lippman, 2001) e che vari tipi di tumori solidi, come i carcinomi al pancreas (Ding et al., 1999; 2001; 2003) e alla prostata (Ghosh and Myers, 1998; Pidgeon et al., 2002) sovra-esprimono almeno una delle diverse isoforme di LOX; tuttavia non è mai stato dimostrato il ruolo delle LOX nella linfomagenesi.

Numerosi studi di Jakobsson e colleghi hanno sottolineato l'importanza della isoforma 5-LOX nei linfociti B. In particolare è stato dimostrato che linee cellulari di linfoma di

Burkitt, positive al virus di EB, molto simili a quelle utilizzate nel presente lavoro, sono in grado di convertire l'acido arachidonico nei metaboliti 5-HETE e LTB4 ed in maggiore entità rispetto a linee EBV negative (Jakobsson et al., 1991); in questi studi l'espressione della 5-LOX è stata messa in luce attraverso analisi Western Blotting (Jakobsson et al., 1992) mentre studi di immunoistochimica hanno permesso di evidenziare una localizzazione nucleare di questo enzima nelle cellule B (Jakobsson et al., 1995).

Werz e colleghi hanno definito gli stimoli che nei linfociti B comportano l'attivazione della 5-lipossigenasi: l'acido arachidonico, i perossidi, il Ca++, ma anche lo shock osmotico; inibitori di protein tirosin fosfatasi, citochine infiammatorie; l'attività della 5-LOX è dipendente da eventi fosforilativi che interessano la Serina 271, fosforilata tramite la via della p38MAPK e la Serina 663, fosforilata tramite la via di ERK1/2 (Werz et al., 1996; 2000, 2001, 2002, 2005).

Anche nel nostro sistema cellulare di linfoma di Burkitt è stata studiata, mediante RT-PCR qualitativa, l'espressione delle varie isoforme lipossigenasiche, ed è stato trovato che sono sovra-espresse nella linea EBV+ E2R rispetto a BL41, le isoforme 12-LOX e 5-LOX, mentre le altre lipossigenasi sono solo debolmente espresse o assenti, così come le ciclossigenasi. L'analisi di espressione della isoforma 5-LOX è stata effettuata anche mediante PCR quantitativa in Real-Time (Light Cycler) estendendola a tutti i cloni cellulari ed è stato possibile dimostrare una chiara e diretta correlazione tra i livelli ossidativi e l'espressione di questo enzima: la presenza extra di perossidi nelle linee EBV+ potrebbe quindi essere la spia di una elevata attività della 5-LOX e i ROS dei sottoprodotti dell'attività lipossigenasica.

Quindi nel nostro sistema cellulare esiste una diretta correlazione tra livelli di perossidi, espressione della 5-LOX e la diversa sensibilità/resistenza delle linee BL41 ed E2R all'inibizione di questo enzima: la linea cellulare solitamente più resistente ai trattamenti apoptogeni (E2R) risulta infatti estremamente sensibile all'azione di inibitori specifici della 5-LOX (AA861, MK886 e BWA4C) con un comportamento opposto a quello di solito osservato con altri agenti apoptogeni.

Particolarmente tossico sulla linea E2R è l'inibitore redox della 5-LOX, AA861, un composto che esplica la propria azione influenzando lo stato ossidativo del ferro al sito catalitico dell'enzima. Il ruolo dei perossidi nella stimolazione dell'attività della 5-LOX in E2R è dimostrato dagli effetti protettivi del perossido d'idrogeno e sensibilizzanti dell'analogo della vitamina E, detto Trolox, sull'apoptosi indotta da AA861.

E' stato visto, d'altra parte, che non è sufficiente ridurre i livelli di perossidi spontanei mediante una semplice azione antiossidante, per esempio mediante Trolox, per suscitare un effetto tossico su questa linea cellulare: anche questa evidenza suggerisce che i perossidi hanno un ruolo accessorio nella sopravvivenza cellulare della linea E2R, agendo come sottoprodotti funzionali dell'attività lipossigenasica piuttosto che come modulatori della sopravvivenza stessa (per esempio tramite NF-kB).

Le lipossigenasi sembrano intervenire promuovendo la carcinogenesi e regolando la sopravvivenza tramite una segnalazione molto più specifica e complessa (rispetto alla mera produzione secondaria di ROS) che chiama in causa i metaboliti prodotti da questi enzimi ed in particolare gli HETE.

E' noto dalla letteratura che gli acidi idrossieicosatetraenoici contrastano gli effetti antiproliferativi ed apoptotici suscitati dall'inibizione delle lipossigenasi in vari sistemi

cellulari; lo stesso risultato è stato ottenuto sulla nostra linea cellulare E2R ma non su BL41.

Le diverse isoforme di HETE mostrano la capacità di proteggere E2R dall'inibizione delle LOX a concentrazioni nanomolari ed il loro effetto è più rilevante se, sia il 5-HETE sia il 12-HETE, sono somministrati contemporaneamente e congiuntamente ai vari inibitori: ad NDGA (inibitore generico delle LOX), ad AA861 e BWA4C (inibitori specifici della 5-LOX) e a Baicaleina (inibitore specifico della 12-LOX). Il 5-HETE da solo mostra comunque un più elevato effetto protettivo sull'apoptosi indotta da NDGA, da AA861 e BW4C, mentre il 12-HETE da solo è attivo soprattutto sull'apoptosi indotta da Baicaleina; sorprendentemente è stato visto che anche il 15-HETE è in grado di proteggere dall'apoptosi indotta da AA861.

Comunque l'azione di protezione dall'apoptosi rimane confinata alla classe degli HETE; infatti il metabolita della 15-LOX1, 13-HODE, che si genera a partire dal substrato acido linoleico, una molecola strutturalmente molto simile agli HETE, non è in grado di proteggere dall'apoptosi; infine gli HETE non sono in grado di proteggere da altri stimoli apoptogeni come per esempio dalla puromicina.

Sono state proposte due strade alternative attraverso cui gli HETE possono mediare segnali proliferativi intervenendo nella crescita, nel potenziale metastatico e nell'angiogenesi di vari tipi di cancro.

La prima di queste vie prevede una interazione tra gli HETE e particolari recettori nucleari detti PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors); esistono tre diverse isoforme recettoriali (PPAR α, β e γ) la cui espressione è stata verificata nelle nostre linee cellulari E2R e BL41: più precisamente tutte e tre le isoforme risultano espresse senza mostrare differenze tra le due linee.

E' stato quindi ipotizzato che l'effetto protettivo del 5-HETE fosse dovuto ad una interazione tra questo metabolita ed i PPARα; sono stati così eseguiti esperimenti di protezione, simili a quelli portati a termine con il gli HETE, sfruttando gli agonisti dei PPARα, Wy e Clofibrate, ma non è stato ottenuto il risultato sperato; interessante è stato invece notare che tra gli agonisti dei PPAR γ, Troglitazone e 15-dPGJ2, solo quest'ultima sostanza induce significativamente apoptosi e soprattutto sulla linea cellulare E2R.

Anche il 15-HETE è considerato un agonista dei PPARγ (Shappell et al., 2001); ma mentre questo metabolita in linee tumorali di cancro alla prostata ha effetti apoptogeni, nel nostro sistema cellulare B protegge dall'apoptosi. Così pur essendo 15-HETE e 15-dPGJ2 entrambi γ-agonisti, essi hanno un'azione opposta riguardo l'apoptosi in E2R; è molto probabile che la 15-dPGJ$_2$ induca morte cellulare nei linfomi con un meccanismo diverso dall'interazione con il PPARγ, probabilmente attraverso l'inibizione di NF-kB (Piva et al., 2005).

Esiste un secondo meccanismo con cui gli HETE possono mediare segnali proliferativi e di sopravvivenza che prevede l'interazione di questi metaboliti con recettori di membrana associati a proteine G e la successiva attivazione di vie di trasduzione del segnale; il 12-HETE attiva la via di ERK1/2 in linee cellulari di carcinoma all'epidermide (Nie et al., 2000) e sempre la via di MEK/ERK in linee cellulari di cancro al pancreas (Ding et al, 2001); il 5-HETE attiva la via di MEK/ERK e la via della PI3K/Akt sia in cellule di cancro al pancreas ma anche in linee cellulari di cancro alla prostata (Ding et al., 2003); il 15-HETE interviene nell'attivazione della via della p38MAPK in cellule di carcinoma al seno (Nony et al., 2005). L'azione stimolatrice degli HETE sulle diverse vie di trasduzione risulta bloccata dalla tossina della pertosse,

ma non sono stati ancora clonati i recettori di membrana coinvolti in questa segnalazione (Szekeres et al., 2000). E' stato supposto che esistono più recettori putativi in grado di legare questi metaboliti con diversa affinità.

Allora la sovrapposizione degli effetti tra i singoli HETE, da noi osservata, può essere spiegata da una competizione tra le varie isoforme per il legame al recettore che media la loro azione; ogni HETE avrebbe quindi un recettore specifico a cui legarsi con maggiore affinità, ma avrebbe anche la possibilità di legare, con affinità inferiore, i recettori specifici delle altre isoforme. Non è possibile comunque escludere che gli HETE si convertano da una forma in un'altra o che addirittura esistano delle forme intermedie di HETE a mediare il reale effetto biologico osservato. E'stato per esempio dimostrato che la 5-LOX, in leucociti polimorfonucleati, viene inibita da concentrazioni μmolari di 15-HETE; quest'ultimo metabolita può essere trasformato dalla 5-LOX dando origine al composto 5,15-diHETE (Petrich et. al,1996).

Sono attualmente in corso esperimenti volti a chiarire in che maniera gli HETE intervengono nella sopravvivenza cellulare nel nostro sistema di linfoma di Burkitt.

Si stanno in particolare portando a termine prove di citotossicità mediante la wortmannina, un inibitore della via della PI3K/Akt; SB-203580, che inibisce la p38MAPK, SP-600125 inibitore di JNK; ancora si sta indagando sul coinvolgimento, nella segnalazione HETE mediata, della via di MEK/ERK tramite l'inibitore PD-98059. Si vuole verificare se inibitori di queste vie, di per sé non tossici sulla linea E2R, possono bloccare la protezione esplicata dagli HETE sull'apoptosi indotta da AA861.

E' stato già sottolineato che proteine virali come LMP1 ed LMP2A del virus di Epstein Barr stimolano le vie di segnalazione delle MAPK e di Akt promuovendo la sopravvivenza cellulare; alternativamente all'espressione di oncogeni virali si può

supporre che EBV utilizzi la sovra-espressione delle LOX, e principalmente della 5-LOX, e l'attività lipossigenasica tramite gli HETE come strategia per modulare le MAPK, Akt ed NF-kB. E' stato trovato che le nostre linee cellulari EBV+ deficiano nell'espressione di LMP1 mentre si sta attualmente valutando l'espressione di LMP2A.
Si stanno inoltre effettuando altri esperimenti, mirati a definire una relazione tra le alterazioni del metabolismo dell'acido arachidonico e le vie di trasduzione del segnale delle MAPK e della PI3K/Akt, in particolare tramite Western Blotting; si vuole vedere se ad un trattamento con AA861 segue una diminuzione nel rapporto tra le forme fosforilate (attive) di Akt , di ERK e della p38MAPK, rispetto a quelle defosforilate (inattive).

- **Controllo diretto del processo apoptotico:**

Nonostante l'assenza di LMP1, nei nostri cloni EBV+ è stata trovata una sovra-espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 che deve quindi derivare da un differente meccanismo. La sovra-espressione di Bcl-2, nella linea cellulare E2R, sembra essere costitutiva e non viene modulata né dallo stato ossidativo, né da trattamenti apoptogeni come quello con AA861. E' possibile che altri fattori virali, come gli EBERs, intervengano nel regolare l'espressione di Bcl-2 con meccanismi ancora poco conosciuti (Komano et al., 1999).
Inoltre nei linfomi B l'espressione di Bcl-2 è molto spesso controllata da una iper-attività dei fattori trascrizionali della famiglia di c-Rel; NF-kB può quindi essere o modulata in maniera transitoria dai ROS o da alterazioni di vie di segnalazione (MAPK e Akt); ma NF-kB può essere costitutivamente iper-attiva a seguito di alterazioni

genetiche come riarrangiamenti cromosomici, amplificazioni, delezioni e mutazioni puntiformi.

Per questo motivo gli inibitori di NF-kB sono considerati estremamente promettenti per mettere a punto nuove strategie di cura nel trattamento dei linfomi. Tra l'altro il Rituximab, l'anticorpo monoclonale contro il CD20, agisce inattivando NF-kB e potenziando la risposta dei linfomi ai comuni protocolli chemioterapeutici (Jazirehi et al., 2005).

Abbiamo avuto modo di verificare, da un precedente lavoro, che la nostra linea di linfoma di Burkitt E2R è molto più sensibile, rispetto a BL41, agli inibitori di NF-kB come il Parthenolide oltrechè all'inibizione del proteosoma con lactacistina (Tesi Dott. Alberto Alfonsi). Ciò lascia supporre che NF-kB venga attivato dopo la conversione delle cellule con il virus di EB.

Tra le proteine up-regolate da NF-kB, vi sono le proteine della famiglia delle IAP (Hong et al., 2000). Vari membri della famiglia delle IAP sono sovra-espressi nei linfomi e nelle leucemie (Wrzesieň-Kuś et al., 2004; Schliep et al., 2004; Tamm et al., 2000) e in vari altri tipi di cancro; tra questi la survivina (Adida et al., 2000; Martinez et al., 2004) , cIAP1, cIAP2 (Liu et al., 2001) ed XIAP (Kashkar et al., 2003).

Mediante Western Blotting è stata quindi analizzata l'espressione della più potente delle IAP (XIAP) nelle nostre linee cellulari e abbiamo potuto constatare una espressione basale molto alta di questa proteina inibitrice dell'apoptosi in entrambe le linee BL41 ed E2R (senza sostanziali differenze).

XIAP lega mediante il dominio BIR3 la piccola subunità p12 della caspasi 9 attiva e mediante il dominio BIR2, ed alcuni amminoacidi tra BIR1 e BIR2, la subunità p11 della caspasi 3 attiva (Holcik et al., 2001).

Estremamente interessante è stato notare dai Western Blotting che la caspasi 9 è basalmente attiva nelle nostre linee cellulari e che non si ha una ulteriore e sostanziale attivazione di questa caspasi iniziatrice dopo trattamenti apoptogeni di vario tipo e cioè con AA861 (inibitore della 5-LOX), con Parthenolide (inibitore di NF-kB) e con puromicina (inibitore della sintesi proteica).

L'osservata attivazione costitutiva della caspasi 9 è in linea con altri dati presenti in letteratura che indicano in generale un'attivazione basale delle caspasi nel cancro che viene a conferire un significato funzionale alla sovra-espressione delle IAP nella resistenza all'apoptosi (Yang et al., 2003).

Da saggi fluorimetrici di attivazione delle caspasi è stato visto che la linea cellulare E2R presenta costitutivamente attiva anche la caspasi 8 e che questa caspasi non si attiva ulteriormente dopo trattamenti con l'inibitore del proteosoma C.I. (inibitore delle calpaine) o con puromicina; la caspasi 8 risulta invece attivarsi sulla linea BL41 dopo trattamenti apoptogeni (Tesi Dott Alberto Alfonsi).

Quindi la caspasi 8 costitutivamente attiva su E2R potrebbe mantenere basalmente attiva anche la caspasi 3.

Saggi fluorimetrici sull'attivazione della caspasi 9, confermano che in E2R questa caspasi si attiva scarsamente dopo trattamenti apoptogeni con puromicina e l'inibitore delle calpaine mentre risulta attivarsi in maniera significativa la caspasi 3. La caspasi 3 è fortemente attivata anche nella linea BL41 dopo trattamento con puromicina, valinomicina e inibitore delle calpaine (Tesi Dott Alberto Alfonsi).

Tutto ciò porta alla conclusione che gli stimoli che riescono ad innescare il processo apoptotico, nella linea cellulare E2R, devono interferire con la protezione 'a valle' fornita da XIAP contro l'attivazione basale delle caspasi ed in particolare della caspasi

3. Tuttavia dall'analisi mediante Western Blotting risulta che, dopo un trattamento apoptogeno con AA861 (inibitore della 5-LOX), in E2R non si verifica una sostanziale diminuzione della banda corrispondente alla pro-caspasi 3.

Si stanno attualmente eseguendo altre prove con un anticorpo specifico per i frammenti p11 e p17 della caspasi 3, per verificare se questa caspasi effetrice è costitutivamente già attiva nei controlli o se essa viene attivata da un trattamento apoptogeno.

Potrebbe darsi che, in E2R, l'assenza di una diminuzione della banda relativa al frammento p32 derivi dalla scarsa necessità di attivazione 'de novo' della pro-caspasi 3 dopo la liberazione del frammento attivo p11 da parte di XIAP.

Il ruolo di XIAP nel conferire resistenza all'apoptosi nelle nostre linee, e soprattutto in E2R, è dimostrato dalla forte diminuzione della banda relativa a questa proteina che si osserva sempre quando viene indotta apoptosi in E2R ma meno fortemente nella linea BL-41; la diminuzione di XIAP risulta ancora più significativa se si considera che, sia dopo trattamento con AA861 sia dopo trattamento con Parthenolide, non si osserva modulazione di un'altra importante proteina antiapoptotica e cioè Bcl-2.

La diminuzione di XIAP è sempre accompagnata da un rilascio di Smac dai mitocondri che avviene molto più precocemente rispetto al rilascio mitocondriale di citocromo c.

Il rilascio di Smac dai mitocondri è indispensabile per eliminare il blocco delle caspasi attive ed in particolar modo il blocco sulla caspasi 3.

Per confermare queste evidenze sono state fatte prove di tossicità in cui le cellule della linea E2R sono state trattate con AA861 e con specifici inibitori delle caspasi 8, 9 e 3 ed è stato possibile constatare che solo l'inibitore della caspasi 3 riesce a proteggere dalla morte cellulare. L'inibizione della caspasi 3 protegge anche dalla morte cellulare indotta da Parthenolide e da Puromicina.

Questi dati indicano, in generale, che per superare la resistenza ai trattamenti chemioterapi, tipica dei linfomi, si possono sperimentare nuovi protocolli di cura basati sull'uso di inibitori delle LOX oltrechè su inibitori delle vie delle MAPK, di Akt e di NF-kB; nuove possibilità di cura possono inoltre derivare da farmaci in grado di eliminare gli effetti protettivi di fattori antiapoptotici, come X-IAP e le altre proteine di questa famiglia, che agiscono 'a valle' nel macchinario apoptotico.

Per bloccare XIAP, e sensibilizzare alla chemioterapia vari tipi di cancro, è possibile fare uso di strategie basate sulla somministrazione di oligonucleotidi antisenso o di siRNA; ancora si possono utilizzare peptidi simili a Smac (Hunter et al., 2004; Arnt and Kaufmann, 2003; Wu et al., 2003) o molecole non peptidiche che distruggono l'interazione tra XIAP e la caspasi 3 come i derivati della fenilurea (Schimmer et al., 2004).

- **Un'applicazione del sistema BL41-E2R:**

La linea cellulare E2R che sovra-esprime la 5-LOX rappresenta un ottimo sistema per testare l'azione inibitrice sul metabolismo dell'acido arachidonico di sostanze naturali e di derivati di sintesi: sostanze con una specifica azione inibitoria sulla 5-LOX dovrebbero avere quindi, in parallelo con gli altri inibitori della 5-LOX utilizzati in questo studio, una forte azione apoptogenica su E2R e contemporaneamente un'azione antiossidante.

Il nostro sistema cellulare BL41 vs E2R è stato così utilizzato per studiare l'attività biologica di una particolare classe di lignani i derivati ariltetralinici (Saladino et al., 2005).

Con il termine lignani si definisce un gruppo di composti ottenuti per condensazione di varie molecole di fenilpropano, con varie combinazioni strutturali ed effetti farmacologici differenziati.

Tra i lignani i derivati ariltetralinici sono di particolare interesse poichè possiedono attività antitumorale, antimitotica e immunosoppressiva. I derivati ariltetralinici sono anche inibitori non redox della 5-LOX in quanto interagiscono con il sito di legame dell'acido arachidonico e possono rappresentare una nuova classe di agenti terapeutici per la cura dell'asma, dell'artrite reumatoide e del cancro.

Tra i lignani l'acido nordiidroguaiaretico (NDGA) è un noto inibitore delle lipossigenasi e del metabolismo dell'acido arachidonico, la cui inibizione abbiamo visto ha effetti drammatici sulla sopravvivenza delle nostre cellule di linfoma.

Il più studiato derivato ariltetralinico è la podofillotossina isolata da varie piante del genere *Podophyllum* che è noto inibisce la divisione cellulare a livello dell'assemblaggio dei microtubuli; derivati semi-sintetici della podofillotossina sono l'etoposide e il teniposide, attualmente utilizzati nella cura del carcinoma al testicolo e al polmone, nei linfomi (LH e NHL), nella leucemia linfocitica acuta, nel cancro alla vescica e nei tumori cerebrali.

Negli ultimi anni sono stati sintetizzate delle nuove podofillotossine e dei nuovi derivati ariltetralinici con il fine ultimo di ottenere, dalla modificazione di molecole base, dei composti meno tossici e con attività biologica potenziata.

Sono stati utilizzati in prove di tossicità sulle linee cellulari BL41 ed E2R dei derivati benzochinonici della galbulina e sono stati identificati dei nuovi composti con interessanti attività apoptogeniche; in particolare alcuni dei derivati benzochinonici risultano più tossici sulla linea cellulare E2R rispetto alla parentale BL41.

Ipotizzando una correlazione tra la struttura e l'effetto biologico osservato è possibile affermare che la più potente attività apoptogenica è presente in quei derivati caratterizzati sia da un motivo *para*-benzochinonico nell'anello C sia dall'ossidazione della posizione benzilica C-7 dell'anello B a motivo chetonico o idrossilico. Al contrario l'ossidazione della posizione benzilica C-1 dell'anello B sembra non essere importante per l'azione tossica.

Interessante è stato inoltre notare che sia la galbulina sia i suoi derivati benzochinonici esibiscono un forte potere antiossidante sulla linea solitamente a più alti livelli di perossidi E2R.

Un ulteriore sviluppo della ricerca sarà quello di vedere se all'azione tossica e all'attività antiossidante dei derivati della Galbulina corrisponde una reale inibizione delle LOX, ed in particolare della 5-LOX, mediante analisi in HPLC accoppiata alla spettrometria di massa.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questi anni di intenso impegno desidero porgere infiniti ringraziamenti prima di tutto al Prof. Giampiero Gualandi che mi ha sostenuto e guidato nel lavoro di ricerca fornendomi, attraverso un continuo confronto e scambio di idee, gli strumenti e l'approccio metodologico per affrontare in maniera critica e costruttiva il lavoro sperimentale.

Desidero quindi ringraziare tutti i docenti e i ricercatori dell'area di Genetica per il supporto tecnico e logistico, soprattutto il Prof. Fabrizio Palitti.

Durante questi anni si è inoltre sviluppata una proficua collaborazione con il Laboratorio di Immunologia e Nutrizione; ringrazio il Prof. Niccolò Merendino e la Dott.ssa Gloria Pessina per il lavoro svolto insieme e per gli studi di espressione mediante PCR in Real-Time.

Una gran parte del lavoro è stata possibile grazie alla grande disponibilità e al supporto scientifico della Prof. Lina Ghibelli del Dipartimento di Biologia dell'Università di Tor Vergata; sono quindi molto riconoscente alla Dott.ssa Maria D'Alessio che mi ha dato le basi per svolgere i Western Blotting.

Infine, desidero sentitamente ringraziare il Prof. Raffaele Saladino per il lavoro insieme svolto in cui nostro sistema cellulare è stato usato per saggiare la potenziale attività biologica inibitoria sulla 5-LOX di lignani di neo-sintesi.

BIBLIOGRAFIA

- Adida C., Haioun C., Gaulard P., Lepade E., Morel P., Triere J., Dombret H., Reyes F., Diebold J., Gisselbrecht C., Salles G., Altieri D.C., and Molina T.J. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. Blood, 2000; 96(5): 1921-1925
- Adrian T.E., Ding X.Z. and Tong W.G. The mitogenic effect of 5-lipoxygenase metabolite, 5-HETE on pancreatic cancer cell proliferation through activation of multiple signaling pathways. FASEB J. 2001, 15:A1163
- Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C., Lossos I.S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J.I., Yang L., Marti G.E., Moore T., Hudson Jr J., Lu L., Lewis D.B., Tibshirani T., Sherlock G., Chan W.C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Armitage J.O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M.R., Byrd J.C., Botstein D., Brown P.O. and Staudt L.M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000; 403: 503–511.
- Allen R.G. and Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. Free Radical Biology & Medicine, 2000; 28(3):463–499
- **Ambinder R. Gammaherpesviruses and 'hit-and-run' oncogenesis. Am J Pathol 2000, 156:1–3**
- Andersen M.H., Pedersen L.O., Becker J.C. and Thor Straten P. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptosis Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients Cancer Research 2000; 61:869–872
- Andersen M.H., Pedersen L.O., Capeller B., Bröcker E-B, Becker J.C. and Thor Straten P. Spontaneous Cytotoxic T-Cell Responses against Survivin-derived

MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. Cancer Res. 2001; 61(16):5964-8.

- Arnt C.R. and Kaufmann S.H. The saintly side of Smac/DIABLO: giving anticancer drug-induced apoptosis a boost. Cell Death and Differentiation 2003; 10: 1118–1120
- Atkinson P.G.P, Coope H.J., Rowe M. and Ley S.C. Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus Stimulates Processing of NF-kB2 p100 to p52. Journal of Biological Chemistry 2003; 278(51): 51134-51142.
- Avis I., Hong S.H., Martìnez A., Moody T., Choi Y.H., Trepel J., Das R., Jett M. and Mulshine J.L. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. The FASEB Journal 2001; 15 :2007-2009
- Bai M., Skyrlas A., Agnantis N.J., Kamina S., Kitsoulis P. and Kanavaros P. Cluster analysis of apoptosis-associated bcl2 family protein in diffuse large B-cell lymphomas. Relation with the apoptotic index, the proliferation profile and B-cell differentiation immunophenotypes. Anticancer Research 2004; 24:3081-3088
- Baldwin A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. The Journal of Clinical Investigation 2001; 107(3):241-246
- **Barragàn M., Campàs C., Bellosillo B. and Gil J. Protein Kinases in the Regulation of Apoptosis in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Leukemia and Lymphomas 2003; 44(11): 1865-1870**

- Barth T.F.E., Martin-Subero J.I., Joos S., Menz C.K., Hasel C., Mechtersheimer G., Parwaresch R.M., Lichter P., Siebert R. and Mooller P. Gains of 2p involving the *REL* locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. Blood 2003; 101(9):3681-3686
- **Benhar M., Engelberg D. and Levitzki A. ROS, stress activated kinases and stress signalling in cancer. EMBO reports, 2002; 3(5):420-425**
- Bentley G., Palutke M. and Mohamed A.N. Variant t(14;18) in malignant lymphoma: a report of seven cases. Cancer Genetics and Cytogenetics 2005; 157:12–17
- Boitier E., Gautier J-C. and Roberts R. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. Comparative Hepatology 2003; 31;2(1):3
- Bokoch G.M. and Knaus U.G. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! TRENDS in Biochemical Sciences 2003; 28(9): 502-508
- Bonizzi G., Piette J., Schoonbroodt S., Greimers R., Havard L., Merville M-P. and Bours V. Reactive Oxygen Intermediate-Dependent NF-kB Activation by Interleukin-1β Requires 5-Lipoxygenase or NADPH Oxidase Activity. Molecular and Cellular Biology 1999; 19(3):1950-1960
- Bonnefoy-Berard N., Aouacheria A., Claire Verschelde C., Laurence Quemeneur L., Antoine Marcais A. and Marvel J. Control of proliferation by Bcl-2 family members. Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1644:159– 168

- Cahir-McFarland E.D., Davidson D.M., Schauer S.L., Duong J. and Kieff E. NF-kB inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. PNAS 2000; 97(11): 6055-6060
- Carter B.Z., Milella M., Tsao T., McQueen T., Shober W.D., Hu W., Dean N.M., Steelman L., McCubrey J.A. and Andreeff M. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. Leukemia 2003; 17:2081-2089
- **Cerimele F., Battle T., Lynch R., Frank D.A., Murad E., Choen C., Macaron N., Syxbey J., Smith K., Watnick R.S., Eliopoulos A., Shehata B. and Arbise J.L. Reactive Oxygen signalling and MAPK activation distinguish Epstein-Barr Virus (EBV)-positive versus EBV negative Burkitt's lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005;102(1):175-179.**
- Chair-McFarland E.D., Carter K., Rosenwald A., Giltnane J.M., Henrickson, Staudt L.M. and E. Kieff . Role of NF-kB in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency-III infected cell. Journal of Virology 2004; 78(8): 4108-4119
- Chauhan D., Li G., Hideshima T., Podar K., Mitsiades C., Mitsiades N., Munshi N., Kharbanda S., and Anderson K.C. JNK-dependent Release of Mitochondrial Protein, Smac, during Apoptosis in Multiple Myeloma (MM) Cells. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278(20): 17593-17596
- Chen S-Y, Lu J., Shih Y-C and Tsai C-H. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Regulates c-Jun Protein through Extracellular Signal-Regulated Kinase. Journal of Virology 2002; 76(18): 9556–9561
- Chow K.U., Nowak D., Boehrer S., Ruthardt M., Knau A., Hoelzer D., Mitrou P.S. and Weidmann E. Synergistic effects of chemotherapeutic drugs in

lymphoma cells are associated with down regulation of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), prostate-apoptosis-response-gene 4 (Par-4), death-associated protein (Daxx) and with enforced caspase activation. Biochemical Pharmacology 2003; 66: 711–724

- Clem R.J. Sheu T., Richter B.W.M., Hei W., Thornberry N.A . Duckett C.S. and Hardwick J.M. c-IAP1 Is Cleaved by Caspases to Produce a Proapoptotic C-terminal Fragment. The Journal of Biological Chemistry 2001; 276(10): 7602-7608
- Coffey J., Hodgson D.C. and Gospodarowicz M.K. Therapy of non-Hodgkin's lymphoma. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2003; 30(1):S29-S36
- Cooray S. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase–Akt signal transduction in virus survival. Journal of General Virology 2004; 85:1065–1076
- Cullen J.J., Weydert C., Hinkhouse M.M., Ritchie J., Domann F.E., Spitz D. and Oberley L.W. The Role of Manganese Superoxide Dismutase in the Growth of Pancreatic Adenocarcinoma. Cancer Research 2003; 63:1297–1303
- Dan H.C., Sun M., Satoshi Kaneko S., Feldman R.I., Nicosia S.V., Wang H. Tsang B.K. and Cheng J.Q. Akt Phosphorylation and Stabilization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). The Journal of Biological Chemistry 2004; 279(7): 5405-5412
- Davis R.E., Brown K.D., Siebenlist U. and Staudt L.M. Constitutive Nuclear Factor kB Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. The Journal of Experimental Medicine 2001; 194(12): 1861-1874

- **Dawson C.W., Tramountains G., Eliopoulos A.G.: Estein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Activates the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway to Promote Cell Survival and Induce Actin Filament Remodelling. The Journal of Biological Chemistry 2003;278 (6): 3694-3704.**
- Daynes R.A. and Jones D.C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. Nature Reviews 2002; 2:748-759
- De Graaf A.O., De Witte T. and Jansen J.H. Inhibitor of apoptosis protein : new therapeutic targets in hematological cancers ? Leukemia 2004;18:1751-1759
- Deveraux Q.L., Leo E., Stennicke H.R., Welsh K., Salvesen G.S., Reed J.C. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. Embo J 1999;18:5242–51
- Ding H-Z., Hennig R. and Adrian T.E. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. Molecular Cancer 2003; 2:10
- Ding X.Z., Tong W-G. and Adrian T.E. Multiple Signal Pathways Are Involved in the Mitogenic Effect of 5(S)-HETE in Human Pancreatic Cancer. Oncology 2003;65:285–294
- Ding X-Z, Iversen P., Cluck M.W., Knezetic J.A. and Adrian T.E. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999; 261:218-233
- Ding X.Z., Tong W.G. and Adrian T.E. 12-lipoxygenase metabolite,12(S)-HETE stimulates pancreatic cancer cell proliferation. Involvement of tyrosine phosphorylation and MEK/ERK activation. Int J Cancer 2001, 94:630-636

- Dirmeier U., Hoffmann R., Kilger E., Schultheiss U., Briseno C., Gires O., Kieser A., Eick D., Sugden B. and Hammerschmidt W. Latent membrane protein of Epstein-Barr virus co-ordinately regulates proliferation with control of apoptosis. Oncogene 2005; 24:1711-1717
- Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev 2002; 82: 47–95
- Dutton A., Reynolds G.M., Dawson C.W., Young L.S. and Murray P.G. Constitutive activation of phosphatidyl-inositide 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. J Pathol 2005; 205: 498–506
- Elenitoba-Johnson K.S.J., Jenson S.D., Abbott R.T., Palais R.A., Bohling S.D., Lin Z., Tripp S., Shami P.J., Wang L.Y., Coupland R.W., Buckstein R., Perez-Ordonez B., Perkins S.L., Dube I.D and Lim M.S. Involvment of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen activated protein kinase as target for therapy. PNAS 2003; 100(12): 7259-7264
- Escher P. and Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. Mutation Research 2000; 488:121–138
- Fan Y-S and Rizkalla K. Comprehensive cytogenetic analysis including multicolor spectral karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization in lymphoma diagnosis: a summary of 154 cases. Cancer Genetics and Cytogenetics 2003; 143:73–79
- Feng B., Cheng S., Pear W.S. and Liou H. NF-kB inhibitor blocks B cell development at two checkpoints. Medical Immunology 2004, 3(1):1
- Fesik S.W. and Shi Y. Controlling the Caspases. Science 2001; 294:1477-1478

- Feuillard J., Schuhmacher M., Kohanna S., Asso-Bonnet M., Ledeur F., Joubert-Caron R., Bissières P., Polack A., Bornkamm G.W. and Raphaël M. Inducible loss of NF-kB activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-trasformed B lymphocytes. Blood 2000; 95(6): 2068-2075
- Finkel T.. Redox-dependent signal transduction. FEBS Letters, 2000; 476: 52-54
- Fisher G.S. and Fisher R. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. Oncogene 2004; 23: 6524-6534
- Flohè L., Brigelius- Flohè R., Saliou C., Traber M.G.and Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. Free Radical Biology & Medicine, 1997; 22(6):1115-1126
- Ford-Hutchinson A.W., Gresser. and Young R.N. 5-Lipoxygenase.Annu Rev Biochem 1994; 63:383-417
- Fukuda M. and Longnecker R. Latent Membrane Protein 2A Inhibits Transforming Growth Factor1-Induced Apoptosis through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. Journal of Virology 2004; 78(4):1697–1705
- Gan Yan-Jun, Razzouk B.I., Su T. and Sixbey J.W. A Defective, Rearranged Epstein-Barr Virus Genome in EBER-Negative and EBER-Positive Hodgkin's Disease. American Journal of Pathology 2002;160:781-786
- Gargano S., Caporossi D., Gualandi G. and Calef E. Different localization of Epstein-Barr Virus genome in two subclones of the Burkitt lymphoma cell line Namalwa. Genes, Chromosome and Cancer. 1992; 4:205-210

- Ghosh J. and Myers C.E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cell. Proc.Natl.Acad Sci USA 1998; 95:13182-13187
- Ghosh J. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers prostate cancer cell death through rapid activation of c-Jun N-terminal kinase. Biochemical and Biophysical Research Communications 2003; 307:342-349
- Gilabert M.P. and Carmona F.G. Chromatographic analysis of lipoxygenase products. Analytica Chimica Acta 2002; 465:319-335
- Gilabert M.P. and Carmona G. Chromatographic analysis of lipoxygenase products. Analytica Chimica Acta 2002; 465:319-335
- Gilmore T., Gapuzan M-E, Kalaitzidis D. and Starczynowski D. Rel/NF-kB/IkB signal transduction in the generation and treatment of human cancer. Cancer Letters 2002;181:1–9
- Gilmore T.D., Kalaitzidis D., Liang M. and Starczynowski D.T. The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. Oncogene 2004; 23:2275-2286
- Gopalakrishna R. and Jaken S. Protein kinase C signalling and oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine, 2000; 28(9):1349-1361
- Grichenko O.E., Shaposhnikova V.V., Kudryavtsev A.A. and Korystov Y.N. Apoptosis in P388 Leukemia Cells Induced by Specific Inhibitors of 5- and 12-Lipoxygenase and the Product of Cyclooxygenase, Prostaglandin Biology Bulletin 2004; 31(3):221–225.
- Gualandi G., Frezza D., Scotto d'Abusco A., Bianchi E., Gargano S., Giorgi S., Fruscalzo A. and Calef E. Integration of an Epstein-Barr virus episome 3' into

the gene encoding immunoglobulin heavy-chain α1 in a lymphoblastoid cell line. Gene 1995; 166:221-226

- **Gualandi G., GiselicoL., Carloni E., Palitti F. Mosesso P. and Alfonsi A.M.: Enhancement of genetic instability in human B cells by Epstein-Barr virus latent infection. Mutagenesis 2001; 16(3): 203-208.**
- Hachem A. and Gartenhaus R.B. Oncogenes as molecular targets in lymphoma. Blood 2005; 106(6):1911-1923
- Hanada M., Feng J and Hemmings B.R. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1697: 3-16
- Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., Flandrin G., Muller-Hermelink H.R. and Vardiman J. Lymphoma classification-from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. Annals of Oncology 2000; 11(suppl.1): S3-S10
- Hennessy B.T., Hanrahan E.O. and Daly P.A. Non-Hodgkin lymphoma: an update. Lancet Oncology 2004; 5:341-353
- Hennig R., Xian-Zhong Ding, Wei-Gang Tong , Matthias B. Schneider, Standop J., Friess H., Büchler M.W., Pour P.M. and Adrian T.E. 5- Lipoxygenase and Leukotriene B_4 Receptor Are Expressed in Human Pancreatic Cancers But Not in Pancreatic Ducts in Normal Tissue. American Journal of Pathology 2002;161:421-428
- **Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P., Salsman S. and Floyd R.A. Reactive oxygen species, cell signalling and cell injury. Free Radical Biology and Medicine 2000; 28(10): 1456-1462.**

- Hideshima T., Hayashi T., Chauhan D., Akiyama M., Richardson P. and Anderson K. Biologic sequelae of c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK) activation in multiple myeloma cell lines. Oncogene 2003; 22:8797-8801
- Hofer-Warbinek R., Schmid J.A., Stehlik C., Binder B.R., Lipp J. and De Martin R. Activation of NF-kB by XIAP, the X Chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis, in Endothelial Cells Involves TAK1. The Journal of Biological Chemistry 2000; 275 (29) 22064–22068
- Holcik M., Gibson H. and Korneluk R.G. XIAP: Apoptotic brake and promising therapeutic target. Apoptosis 2001; 6:253-261
- Holčík M., Gordon B.W. and Korneluk R.G. The Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Protein XIAP Is Modulated by the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins C1 and C2. Molecular and Cellular Biology 2003;23(1):280–288
- Hong S-Y., Yoon W-H., Park J-H., Kang S-G. Ahn J-H. and Lee T.H. Involvment of two NF-kB binding elements in tumor necrosis factor α-, CD40-, and Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1-mediated induction of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. The Journal of Biological Chemistry 2000; 275(24): 18022-18028
- Hoque A., Lippman S.M., Wu T-T., Xu Y., Liang Z.D., Swisher S., Zhang H., Cao L., Ajani J.A.and Xu X-C. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. Carcinogenesis 2005; 26(4) 785-791
- Houldsworth J., Olshen A.B., Cattoretti G., Donnelly G.B., Teruya-Feldstein J., Qin J., Palanisamy N., Shen Y., Domina K., Petlakh M., Pan Q., Zelenetz A.D.,

Dalla-Favera R., and Chaganti R.S.K. Relationship between *REL* amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. Blood 2004; 103(5):1862-1868

- Hsu J., Shi Y., Frost P., Yan H., Hoang B., Sharma S., Gera J. and Lichtenstein A. Interleukin-6 activates phosphoinositol-3'kinase in multiple myeloma tumor cells by signalling through RAS-dependent and, separately, through p85-dependent pathways. Oncogene 2004; 23:3368-3375
- Hunter A.M., Kottachchi D., Lewis J., Duckett C.S., Korneluk R.G.and Liston P.A. Novel Ubiquitin Fusion System Bypasses the Mitochondria and Generates Biologically Active Smac/DIABLO. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278(9): 7494–7499
- Iqbal J., Sanger W.G., Horsman D.E., Rosenwald A., Pickering D.L., Dave B. , Dave S., Xiao L., Cao K., Zhu Q., Sherman S., Hans C.P., Dennis D. Weisenburger D.D., Greiner T.C., Gascoyne R.D., Ott G., Muller-Hermelink K., Delabie J., Braziel R.M., Jaffe E.S., Campo E., Lynch J.C., Connors J.M., Vose J.M., Armitage J.O., Grogan T.M., Staudt L.M. and Chan W.C. BCL2 Translocation Defines a Unique Tumor Subset within the Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. American Journal of Pathology 2004;165:159-166
- **Irani K., Xia Y., Zweier J.L., Sollott S. J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T. and Goldschmidt-Clermont Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Trasformed Fibroblasts. Science 1997; 275: 1649-1651.**

- **Ishiropoulos H., Gow A., Thom S., Kooy N.W., Royall J.A. and Crow J.P. Detection of reactive nitrogen species using 2,7,-dichloro-dihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. Methods Enzymol 1999; 301: 367-373.**
- **Izumi K.M. Epstein-Barr Virus Signal Trasduction and B-Lymphocyte Growth Trasformation. Progress in Molecular and Subcellular Biology 2004;269-288**
- Jakobsson P-J., Odlander B., Steinhilber D., Rosèn A. and Claesson H-E. Human lymphocytes possess 5-lipoxygenase activity and convert arachidonic acid to leukotriene B_4. Biochemical and Biophysical Research Communications 1991; 178(1):302-308
- Jakobsson P-J., Shaskin P., Larsson P., Feltenmark S., Odlander B., Aguilar-Santelises M., Jondal M., Biberfeld P. and Claesson H-E. Studies on the regulation and localization of 5-lipoxygenase in human B-lymphocytes. Eur. J. Biochem. 1995;232:37-46
- Jakobsson P-J., Steinhilber D., Odlander B., Radmark O., Claesson H-E. and Samuelsson B. On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:3521-3525
- Jazirehi A.R., Huerta-Yepez S., Cheng G. and Bonavida B. Rituximab (Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody) Inhibits the Constitutive Nuclear Factor-kB Pathway in Non-Hodgkin's Lymphoma B-Cell Lines: Role in Sensitization to Chemotherapeutic Drug-Induced Apoptosis. Cancer Res 2005; 65(1): 264-276

- Jones D.C., Ding X., and Daynes R.A Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -(PPARα) Is Expressed in Resting Murine Lymphocytes The Journal of Biological Chemistry 2002; 277(9):6838–6845
- Jox A., Rohen C., Belge G., Bartnitzke S. Pawlita M., Diehl V., Bullerdiek J. and J.Wolf: Integration of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a region of enhanced chromosome instability. Annal. Oncol.1997; 8(2): 131-5
- Juin P., Geneste O., Raimbaud E. and Hickman J.A. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1644: 251– 260
- Julèmont F., Dognè J-M., Laeckmann D., Pirotte B. and de Leval X. Recent developments in 5-lipossygenase inhibitors. Expert Opin. Ther. Patents 2003; 13(1): 1-13
- Kalas W., Kisielow P. and Strzadala L. Inhibition of MEK Induces Fas Expression and Apoptosis in Lymphomas Overexpressing Ras. Leukemia and Lymphomas 2002; 43(7): 1469-1474
- Kanamori M., Watanabe S., Honma R., Kuroda M., Imai S., Takada K., Yamamoto N., Nishiyama Y. and Kawaguchi Y. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein Induces Expression of Thymus- and Activation-Regulated Chemokine in B Cells. Journal of Virology 2004; 78(8): 3984–3993
- Kandasami K., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Thompson C.B., Korsmeyer S.J., Bryant J.L and Srivastava R.K. Involvment of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial distruption and apoptosis: differential regulation of cytocrome c and Smac/DIABLO release. Cancer Research 2003; 63:1712-1721

- Kashkar H., Haefs C., Shin H., Hamilton-Dutoit S.J., Salvesen G.S., Krönke M. and Jürgensmeier J.M. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's Lymphoma-derived B cell. Journal of Experimental Medicine 2003; 198(2):341-347
- Kempen E.C., Yang P., Felix E., Madden T. and Newman R.A. Simultaneous Quantification of Arachidonic Acid Metabolites in Cultured Tumor Cells Using High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Analytical Biochemistry 2001; 297:183–190
- Kinnula V.L. and Crapo J.D. Superoxide Dismutases in malignant cells and human tumors. Free Radical Biology & Medicine 2004; 36(6): 718 – 744
- Kirkin V., Joos S. and Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1644:229– 249
- Kitay M.K. and Rowe D.T. Cell Cycle Stage-Specific Phosphorylation of the Epstein-Barr Virus Immortalization Protein EBNA-LP. Journal of Virology 1996; 70(11):7885-7893
- Komano J., Maruo S., Kurozumi K., Oda T. and Takada K. Oncogenic Role of Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs in Burkitt's Lymphoma Cell Line Akata. Journal of Virology 1999; 73(12): 9827-9831
- **Kondo S., Toyokuni S., Iwasa Y., Tanaka T., Onodera H., Hiai H. and Imamura M. Persistent Oxidative Stress in Human Colorectal Carcinoma, but not in Adenoma. Free Radical Biology and Medicine 1999; 27(3/4): 401-410.**

- Kuhn H., Walther M., Kuban R. J. Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases. Structure, function, and biological implications. Prostaglandins & other Lipid Mediators 2002;68–69: 263–290
- Kuo S-H, Chen L-T, Yeh K-H, Wu M-S, Hsu H-C, Yeh P-Y, Mao T-L, Chen C-L, Doong S-L, Lin J-T and Cheng A-L Nuclear Expression of BCL10 or Nuclear Factor Kappa B Predicts *Helicobacter pylori*–Independent Status of Early-Stage, High-Grade Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas. Journal of Clinical Oncology 2004; 22(17):3491-3497
- Kuppers R. and Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. Oncogene 2001; 20: 5580-5594
- Kuppers R.: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nature Reviews 2005; 5:251-262
- Lee K. and Esselman W.J. Inhibition of PTPs by H_2O_2 regulates the activation of distinct MAPK pathways. Free Radical Biology & Medicine,2002; 33(8): 1121–1132
- Lehmann W.D., Metzger K, Stephan M., Wittig U., Zalán I., Habnenicht A.J.R. and Fürstenberger G. Quantitative Lipoxygenase Product Profiling by Gas Chromatography Negative-Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry . Analytical Biochemistry 1995; 224:227-234.
- Liu H, Ye H., Dogan A, Ranaldi R., Hamoudi R.A., Bearzi I., Isaacson P.G. and Du M-Q. T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. Blood 2001; 98(4):1182-1187

- Liu R.Y, Fan C., Liu G., Olashaw N.E. and Zuckerman K.S. Activation of p-38 Mitogen-activated Protein Kinase Is Required for Tumor Necrosis Factor-α-supported Proliferation of Leukemia and Lymphoma Cell Lines. The Journal of Biological Chemistry 2000; 275(28):21086-21093
- Los M., Schenk H., Hexel K., Baeuerle P.A., Dröge W. and Schulze-Osthoff K. IL-2 gene expression and NF-kB activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. The EMBO Journal 1995; 14(15): 3731-3740
- Lucas P.C., McAllister-Lucas L.M. and Nunez G. NF-kB signaling in lymphocytes: a new cast of characters. Journal of Cell Science 2004; 117 (1):31-39
- Luo W.J., Takakuwa T., Ham M.F., Wada N., Liu A., Fujita S., Sakane-Ishikawa E. and Aozasa K. Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). Lab. Invest. 2004; 84(9):1193-9
- MacFarlane M., Merrison W., Bratton S.B., and Cohen G.M. Proteasome-mediated Degradation of Smac during Apoptosis: XIAP Promotes Smac Ubiquitination *in Vitro.* Journal of Biological Chemistry 2002; 277(39): 36611–36616.
- Martinez A., Bellosillo B., Bosch F. , Ferrer A., Marce´ S., Villamor N., Ott G., Montserrat E., Campo E. and Colomer D. Nuclear Survivin Expression in Mantle Cell Lymphoma Is Associated with Cell Proliferation and Survival. American Journal of Pathology 2004; 164(2):501-510

- Maryalice Stetler-Stevenson Flow cytometry in lymphoma diagnosis and prognosis: useful? Best Practice & Research Clinical Haematology 2003; 16 (4):583–597
- Mathas S., Hinz M., Anagnostopoulos I., Krappmann D., Lietz A., Jundt F., Bommert K., Mechta-Grigoriou F., Stein H., Dörken B. and Scheidereit C. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kB. The EMBO Journal 2002; 21(15): 4104-4113
- Matsumoto Y., Nomura K., Matsumoto S., Ueda K., Nakaoa M., Nishida K., Sakabe H., Yokota S., Horiike S., Nakamine H., Nakamura S. and Taniwaki M. Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. Cancer Genetics and Cytogenetics 2004; 150:22–26
- McCann E.M., Kelly G.L., Rickinson A.B. and Bell A.I. Genetic analysis of the Epstein–Barr virus-coded leader protein EBNA-LP as a co-activator of EBNA2 function. Journal of General Virology 2001; 82:3067–3079
- McCormick F. Survival pathways meet their end. Nature 2004; 428(18):267-269
- McGill K.A. and Busse W.W. Zileuton. The Lancet 1996; 348: 519–24
- Merchant M., Caldwell R.G. and Longnecker R. The LMP2A ITAM Is Essential for Providing B Cells with Development and Survival Signals In Vivo. Journal of Virology. 2000; 74(19):9115-9124

  MHC Class I-restricted T-Cell Epitopes *in Situ* As Well As *ex Vivo* in Cancer Patients. Cancer Research 2001; 61:5964–5968

- Mitsiades N., Mitsiades C.S., Poulaki V., Chauhan D., Richardson P.G., Hideshima T., Munshi N., Treon S.P. and Anderson K.C. Biologic sequelae of nuclear factor-kB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. Blood 2002; 99(11):4079-4086
- Moscat J., Diaz-Meco M.T. & Rennert P. NF-κB activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. EMBO reports 2003; 4(1): 31-36
- Munzert G., Kirchner D., Stobbe H., Bergmann L., Schmid R.M., Döhner H. and Heimpel H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: analysis of NF-kB/Rel-regulated inhibitors of apoptosis Blood 2002; 100(10): 3749-3756
- Nachmias B., Ashhab Y. and Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. Seminars in Cancer Biology 2004; 14:231–243
- Nachmias B., Ashhab Y., Bucholtz V., Drize O., Kadouri L., Lotem M., Peretz T., Mandelboim O.and Ben-Yehuda D. Caspase-Mediated Cleavage Converts Livin from an Antiapoptotic to a Proapoptotic Factor: Implications for Drug-Resistant Melanoma. Cancer Research 2003; 63:6340–6349
- Nakashima I., Takeda K., Kawamoto Y., Okuno Y., Kato M. and Suzuki H. Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005; 434: 3–10
- **Nambo A. and Takada K. The role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. Reviews in Medical Virology 2002; 12:321-326**

- **NamboA., Inoue K., Adachi-Takasawa K. and Takada K. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-α-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. The EMBO Journal 2002; 21(5): 954-965**
- Nerurkar A.Y., Vijayan P., Srinivas V., Soman C.S., Dinshaw K.A., Advani S.H., Magrath I., Bhatia K., Naresh K.N. Discrepancies in Epstein-Barr virus association at presentation and relapse of classical Hodgkin's disease: impact on pathogenesis. Ann Oncol 2000; 11:475–478
- Nie D., Nemeth J., Qiao Y., Zacharek A., Li L., Hanna K., Tang K., Hillman G.G., Cher M.L., Grignon D.J. and Honn K.V. Increased metastatic potential in human prostate carcinoma cells by overexpression of arachidonate 12-lipoxygenase. Clinical & Experimental Metastasis 2003; 20**:** 657–663
- Nie D., Tang K., Diglio C. and Honn K.V. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. Blood 2000; 95(7):2304-2311
- Nony P.A., Kennett S.B., Glasgow W.C., Olden K., and Roberts J. D. 15(*S*) Lipoxygenase-2 Mediates Arachidonic Acid-stimulated Adhesion of Human Breast Carcinoma Cells through the Activation of TAK1, MKK6, and p38 MAPK. The Journal of Biological Chemistry 2005; 280(36): 31413–31419
- O'Flaherty J.T., Rogers L.C., Chadwell B.A., Owen J.S., Rao A., Cramer S.D., and Daniel L.W. 5(*S*)-Hydroxy-6,8,11,14-*E,Z,Z,Z*-eicosatetraenoate Stimulates PC3 Cell Signaling and Growth by a Receptor-dependent Mechanism. Cancer Research 2002; 62: 6817–6819
- Ottensmeier C. The classification of lymphomas and leukemias. Chemico-Biological Interactions 2001;135-136: 653-664

- Padilla J., Kaur K., Cao H.J., Smith T.J. and Phipps R.P. Peroxisome Proliferator Activator Receptor-γ Agonists and 15-Deoxy-$^{\Delta 12,14}$-PGJ2 Induce Apoptosis in Normal and Malignant B-Lineage Cells. The Journal of Immunology 2000; 165: 6941–6948.
- Padilla J., Leung E. and Phipps R.P. Human B Lymphocytes and B lymphomas Express PPARγ and are killed by PPARγ agonists. Clinical Immunology 2002; 103(1):22-33
- Patke A., Mecklenbrauker I. and Tarakhovsky A. Survival signaling in resting B cells. Current Opinion in Immunology 2004; 16:251–255
- Paul A., Wilson S., Belham C.M., Robinson C.J.M., Scott P.H., Gould G.W. and Plevin R. Stress-activated Protein Kinases: activation, Regulation and Function. Cell Signal 1997; 9(6): 403-410
- Peng R., Moses S.C., Tan J., Kremmer E. and Ling P.D. The Epstein-Barr Virus EBNA-LP Protein Preferentially Coactivates EBNA2-Mediated Stimulation of Latent Membrane Proteins Expressed from the Viral Divergent Promoter. Journal of Virology 2005; 79(7): 4492-4505
- **Pennini E. Superoxides Relay Ras Protein's Oncogenic Message. Science 1997; 275:1567-1568.**
- Petrich K., Ludwig P., Kühn H. and Schewe T. The suppression of 5 lipoxygenation of arachidonic acid in human polymorphonuclear leucocytes by the 15-lipoxygenase product (15S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eicosatetraenoic acid : structure–activity relationship and mechanism of action. Biochemical Journal 1996; 314: 911-916.

- Pidgeon G.P., Kandouz M., Meram A. and Honn K.V. Mechanisms Controlling Cell Cycle Arrest and Induction of Apoptosis after 12-Lipoxygenase Inhibition in Prostate Cancer Cells. Cancer Research 2002; 62: 2721–2727
- Piva R., Gianferretti P., Ciucci A., Taulli R., Belardo G. and Santoro G. 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kB activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. Blood 2005; 105(4):1750-1758
- **Platanias L.C. Map kinase signalling pathway and hematologic malignancies. Blood 2003; 101(12):4667-4679**
- Portis T. and Longnecker R. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. Oncogene 2004; 23:8619-8628
- Rådmark O. Arachidonate 5-lipoxygenase. Prostaglandins & other Lipid Mediators 2002; 68–69: 211–234
- Rao,G. N. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. Oncogene1996; 13**:**713–719
- Reed J.C. and Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. Blood 2005;106 (2): 408-418.
- Rohayem J., Diestelkoetter P., Weigle B., Oehmichen A., Schmitz M., Mehlhorn J., Conrad K. and Rieber P.E. Antibody Response to the Tumor-associated Inhibitor of Apoptosis Protein Survivin in Cancer Patients. Cancer Research 2000; 60:1815–1817

- Romano M., Catalano A., Nutini M., D'Urbano E., Crescenzi C., Caria J., Libner R., Davi G. and Procopio A. 5-Lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvment of vascular endothelial growth factor. The FASEB Journal 2001;15:2326-2336
- Rossi D. and Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signalling in health and disease. Hematologica 2003; 88:212-218
- Rummel M.J., De Vos S., Hoelzer D., Koeffler H.P. and Hofmann W-F. Altered apoptosis pathway in mantle cell lymphoma. Leukemia & Lymphoma 2004;45(1):49-54
- Saladino R., Fiani C., Belfiore M.C., Gualandi G., Penna S. and Mosesso P. Methyltrioxorhenium catalysed synthesis of highly oxidised aryltetralin lignans with anti-topoisomerase II and apoptogenic activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2005; 13: 5949-5960
- Sánchez-Beato M., Sánchez-Aguilera A**.** and Piris M.A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. Blood 2003; 101(4): 1220-1235
- Santoro M.G., Rossi A. and Amici C. NF-kB and virus infection: who controls whom. The EMBO Journal 2003; 11(22):2552-2560
- Sanz L., Garcia-Marco J.A., Casanova B., de la Fuente M.T., Mercedes Garcìa-Gila M, Garcia-Pardo A. and Silva A. Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004; 315:562–567
- Schattner E.J. Apoptosis in lymphocytic leukaemia and lymphomas. Cancer Investigation 2002; 20(5&6):737-748

- Schimmer A.D. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. Cancer Research 2004; 64:7183–7190
- Schimmer A.D., Welsh K., Pinella C., Wang Z., Krajewska M., Bonneau M-J., Pedersen I.M., Kitada S., Scott F. L., Bailly-Maitre B.,Glinsky G., Scudiero D., Sausville E., Salvesen G., Nefzi A.,Ostresh J.M., Houghten R.A. and Reed J.C. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. Cancer Cell 2004; 5:25-35
- Schliep S., Decker T., Schneller F., Wagner H., and Häcker G. Functional evaluation of the role of inhibitor of apoptosis proteins in chronic lymphocytic leukaemia. Experimental Hematology 2004; 32:556–562
- Schneider I. and Bucar F. Lipoxygenase Inhibitors from Natural Plant Sources. Part 2: Medicinal Plants with Inhibitory Activity on Arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and Leukotriene Receptor Antagonists. Phytotherapy Research 2005; 19:263–272
- **Schwarz K.B. Oxidative Stress During Viral Infection : A Review. Free Radical Biology & Medicine 1996; 21(5): 641-649.**
- Shappell S.B., Gupta R.A., Manning S., Whitehead R., Boeglin W.E., Schneider C., Case T., Price J., Jack G.S., Wheeler T.M. , Matusik R.J., Brash A.R. and DuBois R.N. 15S-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Activates Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ and Inhibits Proliferation in PC3 Prostate Carcinoma Cells. Cancer Research 2001; 61:497–503
- Shen Y., Iqbal J., Huang J.Z., Zhou G. and Chan W.C. Bcl-2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. Blood 2004; 104(9): 2936-2939

- Shiozaki E.N. and Yigong Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. TRENDS in Biochemical Sciences 2004; 39(9):486-494
- Shureiqi I. and Lippman S.M. Lipoxygenase Modulation to Reverse Carcinogenesis. Cancer Research 2001; 61:6307-6312
- Siebert R., Rosenwald A., Saudt L.M. and Morris S.W. Molecular features of B-cell lymphoma. Current Opinion in Oncology 2001; 13: 316-324
- Spender L.C., Cannell E.J., Hollyoake M., Wensing B., Gawn J.M., Brimmell M., Packham G. and Farrell P.J. Control of Cell Cycle Entry and Apoptosis in B Lymphocytes Infected by Epstein-Barr Virus. Journal of Virology 1999; 73(6):4678-4688
- Srinivas S., Sample J.T., Sixbey J.W. Spontaneous loss of viral episomes accompanying Epstein-Barr virus reactivation in a Burkitt's lymphoma cell line. J Infect Dis 1998; 177:1705–1709
- Srinivas S.K., Sixbey J.W. Epstein-Barr virus induction of recombinase-activating genes RAG1 and RAG2. J Virol 1995; 69**:** 8155–58.
- Staudt L.M. and Wilson W.H. Focus on lymphomas. Cancer Cell 2002; 2: 363-366
- Steele V.E., Holmes C.A., Hawk E.T., Kopelovich L., Lubet R.A., Crowell J.A., Sigman, C.C.and Kelloff G.J. Lipoxygenase Inhibitors as Potential Cancer Chemopreventives. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 1999; 8: 467–483
- Steinhilber D., Herrmann T. and Roth H.J. Separation of lipoxins and leukotrienes from granulocytes by high-performance liquid chromatography

with a Radial-Pak cartridge after extraction with an octadecyl reversed-phase column. Journal of Chromatography 1989; 493 (2):361-6

- Suzuki Y., Nakabayashi Y. and Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effects in Fas induced cell death. PNAS , 2001 (98)15: 8662-8667
- Y., Nakabayashi Y., Nakata K., Reed J.C. and Takahashi R. X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Inhibits Caspase-3 and -7 in Distinct Modes. Journal of Biological Chemistry 2001; 276(29):.27058–27063
- Szekeres C.K., Tang K., Trikha M., and Honn K.V. Eicosanoid Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase1/2 in Human Epidermoid Carcinoma Cells. J. Biol. Chem 2000; 275(49):38831-38841
- Takakuwa T., Luo W.J., Ham M.F., Sakane-Ishikawa F., Wada N. and K. Aozasa: Integration of Epstein-Barr Virus into Chromosome 6q15 of Burkitt Lymphoma Cell Line (Raji) Induces Loss of *BACH2* Expression. American Journal of Pathology. 2004;164:967-974
- Tamm I., Kornblau S.M., Segall H., Krajewski S., Welsh K., Kitada S., Scudiero D.A., Tudor G., Qui Y.H., Monks A., Andreeff M. and Reed J.C. Expression and Prognostic Significance of IAP-Family Genes in Human Cancers and Myeloid Leukemias. Clinical Cancer Research 2000; 6: 1796-1803
- Tamm I., Trepel M., Cardo´-Vilal M., Sun Y., Welsh K., Cabezas E., Swatterthwait A., Arap W., Reed J.C., and Pasqualini R. Peptides Targeting Caspase Inhibitors. Journal of Biological Chemistry 2003; 278(16): 14401–14405

- Tang D.G., Chen Y.Q. and Honn K.V. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93: 5241–5246
- Tang D.G. and Honn K.V. Apoptosis of W256 Carcinosarcoma Cells of the Monocytoid Origin Induced by NDGA Involves Lipid Peroxidation and Depletion of GSH: Role of 12-Lipoxygenase in Regulating Tumor Cell Survival. Journal of Cellular Physiology 1997;172:155–170
- Thomas R.K., Re D., Wolf J. and Diehl V. Hodgkin's lymphoma: molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. The Lancet Oncology 2004; 5:11-18
- Thorley-Lawson D.A. and Gross A. Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. New England Journal of Medicine 2004; 350: 1328-37
- Tong W-G., Ding X-Z., Witt R.C. and Adrian T.E. Lipoxygenase Inhibitors Attenuate Growth of Human Pancreatic Cancer Xenografts and Induce Apoptosis through the Mitochondrial Pathway. Molecular Cancer Therapeutics 2002; 1:929–935
- Tong W-G., Ding X-Z, Hennig R., Witt R.C., Standop J., Pour P.M. and Adrian T E. Leukotriene B4 Receptor Antagonist LY293111 Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells.Clinical Cancer Research 2002; 8:3232-3242
- Tong W-G., Ding X-Z., and Adrian T.E. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2002; 296: 942–948

- Tong W-G., Ding X-Z., Talamonti M.S., Bell R.H., Adrian T.E. LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 335: 949–956
- **Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J. and Hiai H. Persistent Oxidative Stress in cancer. FEBS Letters 1995; 358: 1-3.**
- Uddin S., Hussain A.R., Al-Hussein K.A., Manogaran P.S., Wickrema A., Gutierrez M.I., and Bhatia K.G. Inhibition of Phosphatidylinositol 3'-Kinase/AKT Signaling Promotes Apoptosis of Primary Effusion Lymphoma Cells. Clin Cancer Res 2005;11(8): 3102-3108
- Van den Bosch C.A. Is endemic Burkitt's lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter? Lancet Oncol 2004; 5: 738–46
- Vaquero E.C., Edderkaoui M., Pandol S.J., Gukovsky I. and Gukovskaya A.S. Reactive Oxygen Species Produced by NAD(P)H Oxidase Inhibit Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. The Journal of Biological Chemistry 2004;. 279(33): 34643–34654
- Verhagen A.M. and Vaux D.L. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. Apoptosis 2002; 7 :163-166
- Viatour P, Bentires-Alj M., Chariot A., Deregowski V., de Leval L., Merville M.P. and Bours V. NF-kB2/p100 induces Bcl-2 expression. Leukemia 2003; 17: 1349-1356
- Viatour P., Merville M., Bours V. and Chariot A. Phosphorylation of NF-kB and IkB proteins: implications in cancer and inflammation. TRENDS in Biochemical Sciences 2005; 30(1):43-52

- Vockerodt M., Haier B., Buttgereit P., Tesch H. and Kube D. The Epstein Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Interleukin-10 in Burkitt's Lymphoma Cells but Not in Hodgkin's Cells Involving the p38/SAPK2 Pathway. Virology 2001;280:183-198
- Wada T. and Penninger J.M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 2004; 23:2838-2849
- Webb A., Cunningham D., Cotter F., Clarke P.A., Di Stefano F., Ross P., Corbo M and Dziewanowska Z. Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. The Lancet 1997;349:1137-1141
- Wendel H.G., De Stanchina E., Fridman J.S., Malina A., Ray S., Kogan S., Cordon-Cardo C., Pelletier J. and Lowe S.W. Survival signalling by Akt and eIF4e in oncogenesis and cancer therapy. Nature 2004; 428(18):332-337
- Werz O. and Steinhilber D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors—lessons from cellular enzyme regulation. Biochemical Pharmacology 2005; 70: 327–333
- Werz O. and Steinhilber D. Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells. Eur.J.Biochem 1996; 242:90-97
- Werz O., Bürkert E., Fischer L., Szellas D., Dishart D., Samuelsson B., Rådmark O., and Steinhilber D. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. The FASEB Journal, 2002; 16 (11):1441-3
- Werz O., Bürkert E., Samuelsson B., Rådmark O. and Steinhilber D. Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. Blood 2002 ; 99 (3): 1044-1052

- Werz O., Klemm J., Rådmark O. and Samuelsson B. p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line. Journal of Leukocyte Biology 2001; 70:830-838
- Werz O., Szellas D. and Steinhilber D. Reactive oxygen species released from granulocytes stimulate 5-lipoxygenase activity in a B-lymphocytic cell line. Eur. J. Biochem 2000; 267:1263-1269
- Werz O., Szellas D., Steinhilber D and Rådmark O. Arachidonic Acid Promotes Phosphorilation of 5-Lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated Protein Kinase 2 (MK2). The Journal of Biological Chemistry 2002; 277(17): 14793-14800
- Willis T.G. and Dyer M.J.S. The role of immunoglobulin traslocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. Blood 2000; 96(3):808-822
- Wong B.C.Y., Wang W.P., Cho C.H., Fan X.M., Lin M.C.M., Kung H.F. and Lam S.K. 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells**.** Carcinogenesis 2001; 22(9): 1349-1354
- Wrzesieň-Kuś A. , Smolewski P., Sobczak-Pluta A., Wierzbowska A. and Robak T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. Apoptosis 2004; 9: 705–715
- Wu T.Y.H., Wagner K.W., Bursulaya B., Schultz P.G. and Deveraux Q.L. Development and Characterization of Nonpeptidic Small Molecule Inhibitors of the XIAP/Caspase-3 Interaction. Chemistry & Biology 2003; 10: 759–767
- **Yajima M., Kanda T. and Takada K. Critical Role of Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded RNA in Efficient EBV-induced B-Lymphocyte Growth Trasformation. Journal of Virology 2005;79(7):4298-4307**

- Yang L., Cao Z., Yan H., and Wood W.C. Coexistence of High Levels of Apoptotic Signaling and Inhibitor of Apoptosis Proteins in Human Tumor Cells: Implication for Cancer Specific Therapy. Cancer Research 2003; 63: 6815–6824
- Yoshimoto T., Takahashi Y. Arachidonate 12-lipoxygenasese. Prostaglandins & other Lipid Mediators 2002; 68–69 :245–262
- **Young L.S. and Murray P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumors. Oncogene.2003;22:5108-5121.P**
- Young R.N. Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? Eur J. Med Chem 1999; 34: 671-685
- Yue H., Strauss K.I., Borenstein M.R., Barbe M.F., Rossi L.J., Jansen S.A. Determination of bioactive eicosanoids in brain tissue by a sensitive reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection. Journal of Chromatography 2004; 803:267–277
- Zheng B., Fiumara P., Li Y.V., Georgakis G., Snell V., Younes M., Vauthey J.N., Carbone A. and Younes A. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. Blood 2003; 102(3): 1019-1027