

INDICE

1. RIASSUNTO	3
2. INTRODUZIONE	5
2.1 La Leucemia Mieloide Cronica e l'Imatinib.....	5
2.2 Gli inibitori di MEK e l'Arsenico Triossido.....	7
3. MATERIALI E METODI	10
3.1 Reagenti.....	10
3.2 Colture cellulari.....	11
3.3 Condizioni di coltura.....	11
3.4 Analisi citofluorimetrica per la valutazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare.....	12
-Propidio Iodido.....	12
-Annexina V/Propidio Iodido.....	12
-Perdita del potenziale di membrana mitocondriale.....	13
3.5 Trasfezione con siRNA.....	13
3.6 Western blot e anticorpi.....	14
3.7 Studio in vivo	14
-Modello leucemico murino.....	14
-Analisi istologiche e immunoistochimiche.....	15
3.8 Analisi statistica.....	16
4. RISULTATI	17
4.1 L'inibizione di MEK potenzia l'effetto citotossico dell'ATO in linee cellulari di LMC Imatinib-resistenti.....	17
4.2 Il trattamento combinato PD+ATO promuove una degradazione dell'oncoproteina Bcr-Abl in cellule Ba/F3p210 ^{T315I} e Ba/F3p210 ^{WT}	20
4.3 Il trattamento combinato attiva la pathway di p73 nelle linee cellulari Ba/F3 Imatinib-sensibili e -resistenti.....	22
4.4 Valutazione della rilevanza biologica della p73 nell'apoptosi indotta dal trattamento combinato PD+ATO in linee cellulari Ba/F3 Bcr-Abl+.....	28
4.5 Valutazione dell'efficacia del trattamento combinato PD+ATO in un modello murino leucemico imatinib-resistente.....	30
5. DISCUSSIONE	36
6. BIBLIOGRAFIA	39

1. RIASSUNTO

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è una malattia caratterizzata dalla presenza di una specifica anormalità cromosomica, il cromosoma Philadelphia, codificante per una proteina di fusione di peso molecolare 210 Kd (p210) chiamata Bcr-Abl, che è una tirosin-chinasi sempre attiva. Il farmaco d'elezione per il trattamento di questa patologia è il tirosin-chinasi inibitore (TKI) Imatinib (Gleevec) che riduce l'attività di Bcr-Abl. L'utilizzo dell'Imatinib in clinica è però limitato dall'insorgenza di resistenza a questo farmaco, sia dovuta all'iperespressione di Bcr-Abl sia per la presenza di mutazioni del gene BCR-ABL che interferiscono con il legame dell'Imatinib. Altri TKIs sono stati sviluppati per il trattamento di questi pazienti, come il Dasatinib e il Nilotinib. Entrambi i farmaci hanno mostrato efficacia nei pazienti resistenti a Imatinib e sono attivi verso la maggior parte delle mutazioni di Bcr-Abl, esclusa la mutazione T315I completamente resistente a Imatinib, Dasatinib e Nilotinib. È per questo che si stanno sviluppando nuove strategie terapeutiche per il trattamento dei pazienti portatori di questa mutazione. In questo studio si è testata l'efficacia della combinazione con inibitori di MEK (PD184352 e PD0325901) associati all'Arsenico Triossido (ATO) in linee cellulari di LMC con diverse alterazioni di Bcr-Abl tra cui la mutazione T315I.

Abbiamo dimostrato che il trattamento con PD aumentava significativamente la citotossicità indotta dall'ATO in tutte le linee cellulari testate di LMC e che l'interazione dei due farmaci era di tipo sinergico nell'induzione dell'apoptosi nella maggior parte delle linee analizzate, compresa quella portatrice della mutazione T315I.

Dallo studio delle proteine mediante western blot abbiamo poi osservato che nelle linee analizzate il trattamento con PD inibiva l'up-regolazione ATO-indotta dell'oncoproteina Bcr-Abl, bloccandone l'attività chinastica, dato confermato anche dall'inibizione della fosforilazione/attivazione della proteina CrkL, substrato riconosciuto di Bcr-Abl.

Abbiamo inoltre dimostrato che uno dei target molecolari della combinazione PD+ATO è la pathway mediata dalla p73. Infatti il trattamento combinato PD+ATO promuoveva un accumulo dell'isoforma proapoptotica e antiproliferativa TAp73 (PD-mediato) e una riduzione dei livelli dell'isoforma antiapoptotica e proproliferativa Δ Np73 (ATO-mediata). Dato che la modulazione del bilanciamento di queste due proteine a favore dell'isoforma proapoptotica TAp73 può contribuire alla suscettibilità delle cellule tumorali alla risposta verso chemioterapici, abbiamo calcolato la ratio TAp73/ Δ Np73 e abbiamo così osservato che nelle linee analizzate il trattamento combinato PD+ATO

portava ad un rilevante aumento del rapporto TAp73: Δ Np73 rispetto ai singoli trattamenti, di circa 3 volte rispetto al PD e 1.5 volte rispetto all'ATO. Lo sbilanciamento dell'equilibrio TAp73: Δ Np73 a favore dell'isoforma TAp73 indotto dal trattamento combinato si è quindi tradotto in un aumento dell'espressione del gene target di p73 p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) e della perdita del potenziale di membrana mitocondriale. Al fine di confermare la rilevanza biologica delle isoforme della p73 in risposta al trattamento combinato PD+ATO abbiamo inibito l'espressione endogena di TAp73 e Δ Np73 mediante trasfezione con specifici siRNA (small interfering RNA), ed abbiamo osservato che il knock-out di TAp73 riduceva significativamente l'apoptosi indotta dal trattamento combinato PD+ATO, mentre il silenziamento della Δ Np73 portava ad un significativo potenziamento dell'effetto citotossico di PD+ATO, confermando il ruolo chiave di queste proteine nell'attivazione dell'apoptosi indotta dal trattamento combinato.

In seguito abbiamo studiato l'efficacia della combinazione PD+ATO in un modello leucemico murino clinicamente rilevante imatinib-resistente Bcr-Abl dipendente. Topi NOD/SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient) inoculati con la linea cellulare portatrice della mutazione T315I sviluppavano una leucemia Imatinib-resistente che portava a morte dell'animale in circa 30 giorni. Dall'analisi istopatologica, immunoistochimica e molecolare effettuata a fine trattamento, fegati e milze dei topi trattati con Imatinib presentavano abbondanti infiltrazioni neoplastiche che confermavano anche la loro aumentata dimensione e peso. Al contrario, i fegati e le milze dei topi trattati con PD+ATO mostravano la loro normale dimensione e un basso grado di infiltrazioni neoplastiche, indice di una forte inibizione della progressione della malattia. Questi dati correlavano strettamente con un significativo aumento della sopravvivenza dei topi trattati con la combinazione PD+ATO rispetto al trattamento con Imatinib.

Questi dati preclinici in vitro ed in vivo dimostrano l'efficacia di questa combinazione su linee cellulari bcr-abl+ Imatinib-resistenti, suggerendo che questo trattamento combinato potrebbe costituire una valida strategia terapeutica per la cura di pazienti portatori della LMC T315I+.

2. INTRODUZIONE

2.1 La Leucemia Mieloide Cronica e l'Imatinib

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è un disordine dell'emopoiesi che origina dalla trasformazione di una cellula staminale emopoietica ed è caratterizzata da proliferazione incontrollata e un progressivo accumulo di cellule differenziate in senso mieloide nel sangue periferico, nel midollo, nella milza e in altri organi periferici.

Il decorso della LMC si divide in tre fasi:

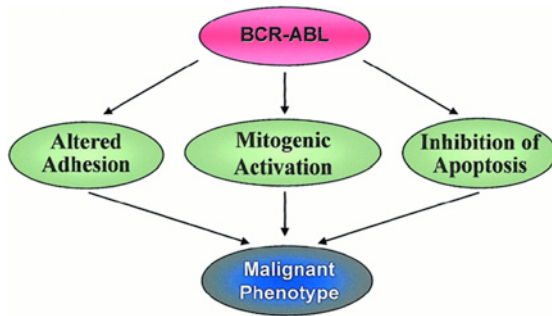
- la fase cronica, relativamente stabile, nella quale si ha un'espansione massiccia della linea granulocitaria;
- la fase accelerata, nella quale si osserva un aumento dei blasti nel sangue periferico e midollare;
- la fase acuta o crisi blastica, caratterizzata da un blocco differenziativo e accumulo dei progenitori ematopoietici mieloidi o linfoidi¹.

La LMC è una delle prime malattie per le quali è stato possibile individuare una specifica anomalia cromosomica come causa della malattia che è il cromosoma Philadelphia o Ph²; il cromosoma Ph è il risultato della traslocazione del gene Abelson (ABL) dal cromosoma 9 ad una regione del cromosoma 22 denominata breakpoint cluster region (BCR). Questo riarrangiamento genera un gene di fusione BCR/ABL codificante per una proteina di fusione di peso molecolare 210 Kd (p210) chiamata Bcr-Abl, che è una tirosin-chinasi costitutivamente attiva³. Il cromosoma Ph è presente in circa il 95% dei casi di LMC, ma si ritrova anche nel 25% delle leucemie linfatiche acute (ALL) dell'adulto e nel 5% delle ALL del bambino⁴. Questa alterazione genetica costituisce il principale marker biologico e diagnostico della LMC. L'espressione dell'oncoproteina Bcr-Abl è necessaria e sufficiente a causare la trasformazione neoplastica⁵ ed influenza molte funzioni metaboliche cellulari come l'induzione della proliferazione cellulare mediante attivazione dei segnali mitogeni, l'inibizione dell'apoptosi e l'alterazione delle proprietà di adesione e aumentata motilità cellulare^{3,6} (Figura 1A). L'attività tirosin-chinasica di Bcr-abl si traduce poi in un'attivazione costitutiva di numerose proteine che regolano le vie di trasduzione del segnale intracellulare tra cui RAS/RAF/MAPK, PI3K-Akt, STAT5, JUN, MYC⁷ (Figura 1B). Tutto ciò porta all'attivazione del ciclo cellulare citochina-indipendente e instabilità epigenetica che comporta poi l'acquisizione di ulteriori alterazioni genetiche che si

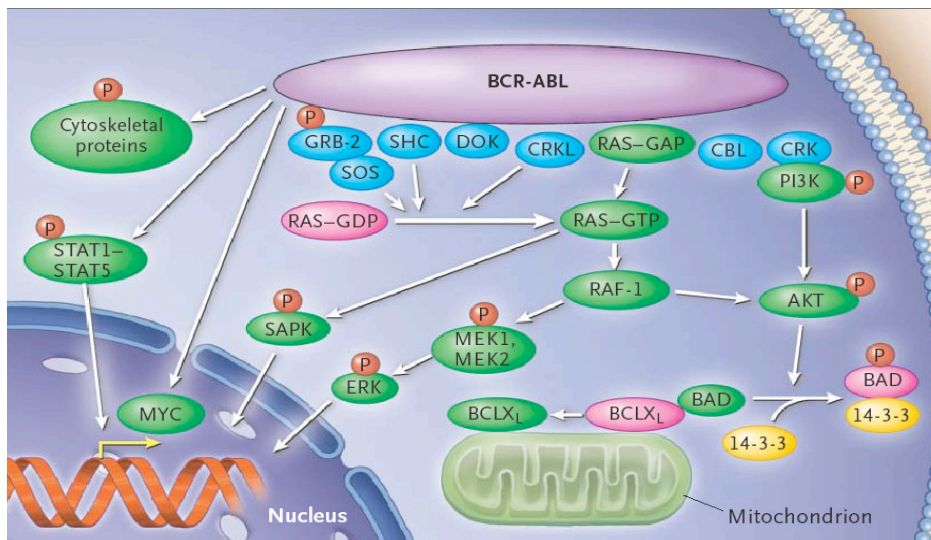
traducono nell'inevitabile progressione della malattia dalla fase cronica alla fase accelerata e alla crisi blastica⁸. Il farmaco d'elezione per il trattamento di questa patologia è il tirosin-chinasi inibitore (TKI) Imatinib mesilato (STI571, Gleevec) (Figura 1C) che riconosce la conformazione inattiva di Bcr-Abl; riducendo l'attività di questa onco-proteina indispensabile per la sopravvivenza, le cellule leucemiche vanno incontro a blocco della proliferazione ed apoptosi, bloccando la progressione della malattia^{9,10}.

Figura 1

A



B



C

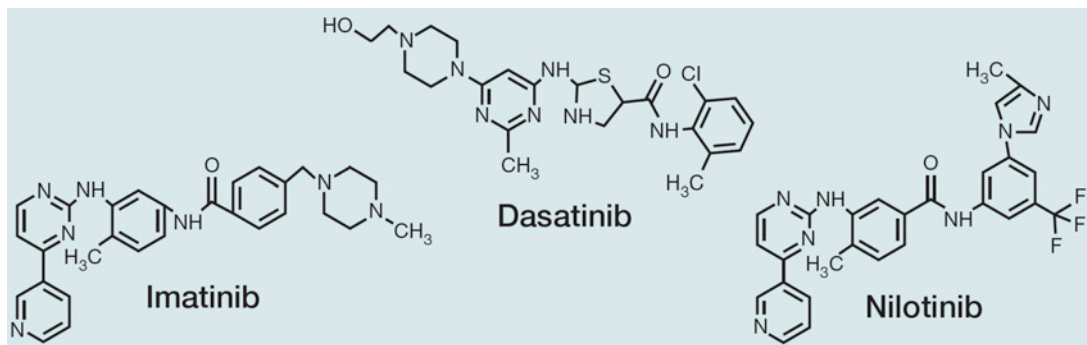


Figura 1. (A) Rappresentazione schematica delle principali funzioni cellulari regolate dall'oncoproteina Bcr-Abl in cellule di LMC. **(B)** Rappresentazione schematica delle vie di trasduzione del segnale attivate da Bcr-Abl in cellule di LMC. **(C)** Struttura chimica dei principali TKi utilizzati nella terapia della LMC.

Nonostante gli eccellenti risultati ottenuti dall'utilizzo in clinica dell'Imatinib in ogni stadio della malattia, circa il 25% dei pazienti di LMC trattati manifesta resistenza sia innata che acquisita^{11,12}. Lo sviluppo della resistenza è legato sia a fattori dipendenti dal paziente, come per esempio una non corretta compliance, ridotto assorbimento intestinale o interazioni tra più farmaci, sia a meccanismi di resistenza specifici della leucemia. Tra questi ultimi, che comprendono la sopravvivenza delle cellule staminali leucemiche quiescenti, l'amplificazione genica di Bcr-Abl e attivazione di vie di segnalazione alternative a Bcr-Abl, lo sviluppo di mutazioni puntiformi nel dominio chinasi di Bcr-Abl è il fattore che ha un ruolo più importante nella progressione della malattia⁸. Sono state documentate oltre 100 mutazioni puntiformi del dominio chinasi di Bcr-Abl che possono colpire amminoacidi che interagiscono direttamente con l'Imatinib o che mantengono Bcr-Abl sempre nella conformazione attiva impedendo dunque il legame con l'Imatinib. Da molti studi è emerso che circa il 50% dei pazienti non responsivi al trattamento con Imatinib presentano una mutazione nel dominio chinasi di Bcr-Abl^{11,12}. Per questo motivo altri TKIs sono stati sviluppati per il trattamento di questi pazienti, come il Dasatinib e il Nilotinib⁷ (Figura 1C). Entrambi i farmaci hanno mostrato efficacia in molti pazienti resistenti all'Imatinib e sono attivi verso la maggior parte delle mutazioni di Bcr-Abl, esclusa la mutazione di Bcr-Abl T315I. L'incidenza di questa mutazione, che è stata documentata per la prima volta da Gorre et al¹³, aumenta in parallelo con la progressione della malattia e lo sviluppo di resistenza clinica in seguito a trattamenti sequenziali con TKIs, e raggiunge il 40% nei pazienti nei quali è fallita la terapia di seconda linea. Nonostante l'efficacia riscontrata dei TKIs di seconda generazione nei pazienti resistenti all'Imatinib, nessuno di questi agenti è efficace in pazienti con mutazione T315I, per i quali la malattia segue il suo decorso^{14,15}. In quest'ottica molti studi si stanno sviluppando per colpire meccanismi molecolari alternativi a Bcr-Abl che possono essere disregolati nella cellula leucemica T315I+.

2.2 Gli inibitori di MEK e l'Arsenico Triossido

La via MAP chinasi mediata da MEK/ERK è un'importante via di trasduzione del segnale intracellulare attivata in risposta a fattori di crescita che porta ad attivazione della proliferazione, differenziamento e sopravvivenza cellulare. La pathway MEK/ERK risulta essere costitutivamente attivata in molti tumori e questa iperattività

conferisce al clone neoplastico un fenotipo aggressivo e resistente a stimoli citotossici. L'attivazione costitutiva della cascata fosforilativa oltre a portare alla proliferazione incontrollata delle cellule neoplastiche è in grado anche di inattivare proteine proapoptotiche fondamentali che perdono così la loro funzione (come per esempio Bad e Bim) o di stabilizzare proteine antiapoptotiche (come Bcl-2 e Mcl-1).

Figura 2

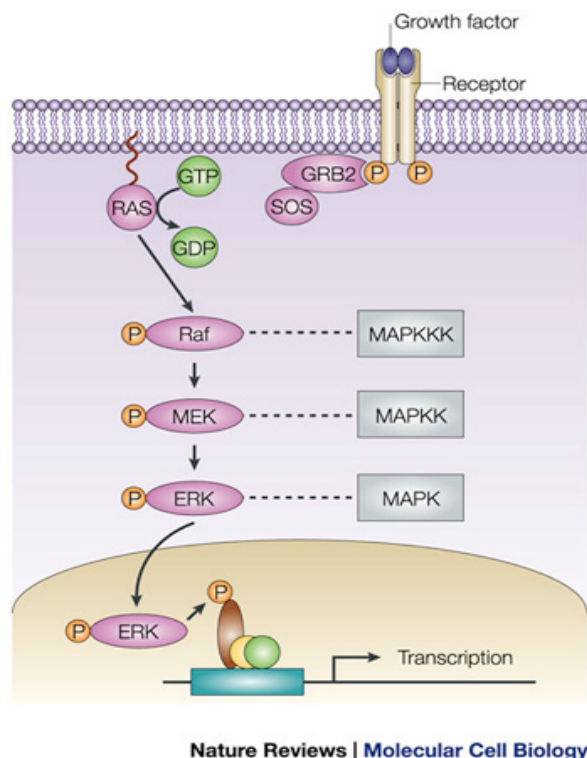


Figura 2. Rappresentazione schematica della via di trasduzione del segnale intracellulare mediata da MEK/ERK.

Vista la rilevanza biologica di questa pathway nello sviluppo e progressione neoplastica, sono stati sviluppati numerosi inibitori di questa via, alcuni già in studio in trias clinici¹⁶.

Gli inibitori di MEK utilizzati in questo studio sono il PD184352 e il suo derivato PD0325901. Questi composti sono potenti inibitori allosterici di MEK che non competono col sito di legame con ATP ma causano una modificazione conformazionale che impedisce il legame col substrato^{17,18}. Questi inibitori altamente selettivi mostrano una potente attività antiproliferativa in vitro e in vivo e abbassano la soglia apoptotica delle cellule neoplastiche in quanto interferiscono sull'equilibrio anti- e pro-apoptotico delle proteine della famiglia Bcl-2, ma bassa attività citotossica^{17, 19-25}. È per questo motivo che si è cercato di potenziarne l'effetto antitumorale associandoli con altri farmaci; uno studio ha infatti dimostrato che il trattamento combinato PD+STI è risultato molto efficace in cellule di LMC sensibili e resistenti all'Imatinib²⁶.

È stata recentemente dimostrata l'efficacia in vitro ed in vivo della combinazione tra MEK inibitori e triossido di arsenico (ATO) in linee cellulari e blasti primari di LAM e in cellule Mieloma Multiplo²⁰⁻²³.

L'ATO è stato usato fin dall'antichità come medicamento nonostante la sua tossicità. Per la sua efficacia sono stati effettuati numerosi studi per il trattamento di malattie ematologiche maligne^{27,28}. L'ATO è risultato particolarmente efficace nel trattamento delle Leucemie Mieloidi Acute (LAM), infatti sopprime la crescita delle cellule neoplastiche sia in vitro che in vivo inducendo sia apoptosi che arresto del ciclo cellulare e, in certe condizioni induce differenziamento delle cellule leucemiche. Sulla base dei risultati ottenuti da studi clinici multicentrici, l'ATO è considerato il trattamento di prima scelta per pazienti con recidive di Leucemia Promielocitica Acuta (APL) refrattari al trattamento con l'acido all-trans-retinoico (ATRA)^{20,21}. È stato infatti dimostrato sia in vivo che in vitro che l'ATO a basse dosi induce differenziamento attraverso la degradazione dell'oncoproteina PML-RAR α , prodotto della traslocazione t(15:17), mentre ad alte dosi inibisce la proliferazione e attiva l'apoptosi, sia con meccanismi dipendenti che indipendenti da PML-RAR α ^{29,30}.

In cellule di LMC è stato dimostrato che l'ATO provoca una degradazione di Bcr-Abl e che è in grado di potenziare l'effetto dell'Imatinib sia in cellule Imatinib-resistenti che mostrano iperespressione di Bcr-Abl, sia in cellule che presentano mutazioni di Bcr-abl, ad eccezione della T315I, nelle quali l'ATO non ripristinava la sensibilità all'Imatinib³¹. Partendo dal presupposto che cellule di LMC mostrano un'attivazione costitutiva di MEK/ERK sia a livello basale che dopo trattamento con Imatinib presentando una forte dipendenza da questa via di segnalazione³², e che è stato dimostrato da Lunghi et al²⁰ che il trattamento combinato PD+ATO era efficace nella linea cellulare di LMC K562 Imatinib-sensibili, ci siamo dunque chiesti se il trattamento combinato PD+ATO potesse essere efficace anche in cellule di LMC Bcr-Abl+ Imatinib resistenti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti

Gli inibitori di MEK PD184352 (2-[cloro-4-iodo-fenilamina]-Nciclopropilmetossi-3,4-difluoro-benzamide) e PD0325901 (N-((R)-2,3-diidrossi-propossi)-3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-iodo-fenilamino)-benzamide), gentilmente forniti dal Dr. J.S. Sebolt Leopold (Cancer Molecular Sciences, Pfizer Global Research & Development, Ann Arbor, MI) sono stati dissolti in dimetilsolfossido (DMSO) ad una concentrazione stock di 10 mM e diluiti in terreno di coltura al momento di utilizzo (Figura 3). Questi reagenti sono inibitori altamente selettivi della fosforilazione ed attivazione di MEK-1. Le dosi utilizzate di 1 μ M per PD184352 o 0.2 μ M per PD0325901 sono state dimostrate efficaci su cellule leucemiche in vitro come precedentemente riportato^{20-23,25}. PD184352 e PD0325901 hanno lo stesso bersaglio molecolare e meccanismo d'azione; il PD0325901 è un derivato del PD184352 ed è stato utilizzato per lo studio in vivo in quanto mostra un'attività anticancro migliore rispetto a PD184352, probabilmente dovuta a fattori farmacologici, come una maggiore durata d'azione e potenza di inibizione di MEK e una migliore solubilità che aumenta poi la biodisponibilità e la stabilità metabolica²⁵.

Figura 3

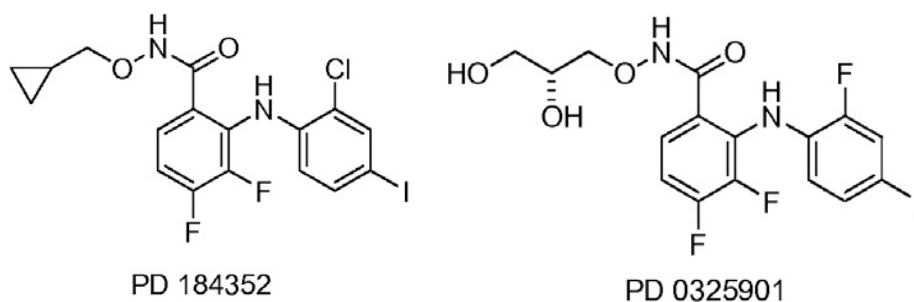


Figura 3. Struttura chimica degli inibitori di MEK1/2 utilizzati in questa studio.

Il triossido di arsenico (ATO) è stato acquistato da Sigma (St. Louis, Mo). ATO è stato dissolto in PBS ad una concentrazione di 1 mM e diluito alla concentrazione di lavoro immediatamente prima dell'uso. Le dosi di ATO utilizzate (1 e 2 μ M) sono state selezionate sulla base di studi precedenti e sono in grado di indurre apoptosi. Le concentrazioni di ATO utilizzate in vitro sono comprese nel range di concentrazione riscontrata nel plasma di pazienti di leucemia acuta promielocitica (APL) trattati con ATO³³. Il Tirosin-inibitore Imatinib proveniente da Novartis (Basel, Switzerland) è stato

sciolto in acqua alla concentrazione di 10 mM, stoccato a -20°C e diluito al momento dell'utilizzo in terreno sterile alla concentrazione di 1 µM.

3.2 Colture cellulari

Le linee cellulari di LMC parentali Ba/F3 (murine) e Imatinib-sensibili K562, LAMA, (umane) sono disponibili in commercio (ATCC Manassas, VA, USA, and DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany). La linea cellulare murina Ba/F3 parentale è stata trasfettata con plasmidi codificanti per Bcr-Abl-p210 wild type (Ba/F3p210^{wt}) e (WT), Bcr-Abl-p210 con mutazione T315I (Ba/F3p210^{T315I}), Bcr-Abl-p210 con mutazione Y253F (Ba/F3p210^{Y253F})³⁴. Le linee Ba/F3 trasfettate sono state gentilmente donate da Dr. Michael W. Deininger. Le mutazioni di Bcr-Abl T315I ed Y253F sono tra le più rappresentate nella popolazione di pazienti affetti da LMC Imatinib-resistenti.

Le linee Imatinib-resistenti umane LAMA84-RES e K562-RES gentilmente donate da Dr. Junia V. Melo, sono state ottenute dalle linee parentali dopo continua esposizione a concentrazioni crescenti di Imatinib e mantenute in 1 µM di Imatinib dopo la stabilizzazione³⁵. La resistenza della linea cellulare LAMA84-R è principalmente dovuta ad una iper-espressione di Bcr-Abl per amplificazione genica^{36,37}; inoltre è stato osservata una significativa over-espressione della proteina permeability glycoprotein 1 (Pgp), anche nota come multidrug resistance protein 1 (MDR1)³⁸; questa proteina è una pompa di efflusso per xenobiotici e media spesso lo sviluppo di farmaco-resistenza in quanto è la principale responsabile del diminuito accumulo di farmaco all'interno delle cellule neoplastiche. La resistenza della linea K562-R è stata a lungo studiata perché non associata ad alcun convenzionale meccanismo, quale l'amplificazione dell'oncogene Bcr/Abl o mutazioni nel sito di legame per l'ATP. L'analisi proteomica su K562 e K562-R ha però evidenziato una differente espressione delle heat-shock protein 70, Hsp70, che sembra essere indotta da fenomeni di stress cellulare³⁹.

3.3 Condizioni di coltura

Le linee cellulari sono state seminate ad una concentrazione di 10⁵ cellule per ml in terreno RPMI 1640 (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) addizionato con siero fetale bovino al 10% (FBS; Sigma-aldrich), L-Glutamina 2mM (Euroclone), penicillina-G (100 U/mL) e Streptomicina (100mg/mL) (PS; Euroclone) e mantenute a 37°C con il 5% di

CO₂. Le cellule sono state preincubate con il veicolo (DMSO) o con gli inibitori di MEK (PD184352 a 1 μ M o PD0325901 a 0.2 μ M) per 3 ore dopo le quali è stato aggiunto l'ATO a 1 e 2 μ M. Dopo 24 ore e 48 ore di trattamento le cellule sono state raccolte e sottoposte ai saggi per la valutazione dell'apoptosi oppure lisate per lo studio delle proteine.

3.4 Analisi citofluorimetrica per la valutazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare

I saggi di citometria a flusso per la valutazione del ciclo cellulare, il contenuto in DNA sub-G1, la perdita del potenziale transmembrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), la marcatura AnnexinaV/Propidio Iodido (PI) sono state eseguite utilizzando l'apparecchio FACSCalibur (Fluorescence-activated cell sorting, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). I Dati sono stati analizzati utilizzando il software FlowJo 3.4 (Tree Star, San Carlos, CA).

-Propidio Iodido

Le cellule trattate con i diversi composti sono state valutate a 24, 48 e 72h dalla stimolazione. Le cellule sono state raccolte a +4°C e lavate in PBS due volte, risospese in una soluzione di Propidio Iodido (50 μ g/ml) (per 1ml di Propidio sono state aggiunte 100U/ml di RNasi (Sigma) e 0.1% di Nonidet P-40) e incubate 1h al buio a 4°C. Dopo l'incubazione è stata effettuata la lettura al citofluorimetro FACS. Il Propidio Iodido è un intercalante fotosensibile della doppia elica del DNA, permette infatti di valutare il contenuto di DNA di ogni cellula e quindi la fase cellulare in cui si trova. Cellule che presentavano un contenuto ipodiploide di DNA (<2n o >0.2n) (fase sub-G1) sono state contate come apoptotiche. Si possono distinguere le fasi del ciclo cellulare individuando e quantificando i picchi corrispondenti alla fase G1, S e G2.

-Annexina V/Propidio Iodido

Le cellule trattate sono state raccolte come sopra descritto e risospese in una soluzione di Annexina V e Propidio Iodido come da protocollo (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA). L'annexina V lega in maniera Ca²⁺ dipendente i residui di fosfatidilserina carichi negativamente ed esposti all'esterno della membrana plasmatica delle

cellule in apoptosi. L'annexina V coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC) permette l'identificazione diretta delle cellule marcate mediante FACS analisi. La doppia marcatura con Propidio Iodido permette la discriminazione di cellule vive, in apoptosi precoce (positive solo per annexina V) e tardiva (positive per propidio iodido e annexina V).

-Perdita del potenziale di membrana mitocondriale

Le cellule stimulate vengono raccolte, centrifugate e risospese in una soluzione di colorante mitocondriale (MitoLight apoptosis detection kit, Chemicon International, Temecula; CA) e incubate a 37°C per 20 minuti. Dopo l'incubazione le cellule vengono centrifugate, risospese in buffer e lette al FACS. Brevemente, in MitoLight è un colorante mitocondriale che permette di discriminare le cellule in apoptosi precoce mediante l'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi_m$. Il colorante emette fluorescenza rossa (aggregati di MitoLight, elevato $\Delta\Psi_m$) quando viene sequestrato dalla membrana mitocondriale delle cellule vive ed è rivelabile nel canale PI; in cellule con membrana mitocondriale alterata il colorante è presente in forma monometrica libera nel citoplasma ed emette una fluorescenza verde (monomeri di MitoLight, basso $\Delta\Psi_m$) ed è rivelabile nel canale FITC.

3.5 Trasfezione di siRNA

Prima della trasfezione le cellule Ba/F3p210^{T315I} e p210^{WT} sono state lavate due volte con terreno freddo serum-free e risospese in serum-free Opti-MEM (Gibco BRL Paisley, United Kingdom) ad una concentrazione finale di 21×10^6 cells/mL. In seguito sono stati prelevati 0.4 ml della sospensione cellulare e si sono aggiunti 1 nmol di un pool di small interfering double-stranded RNAs (siRNA) di controllo non-specifici o specifici per TAp73 o per Δ Np73 (Dharmacon Tech, Lafayette, Co). L'elettroporazione è stata effettuata in cuvette da 0.4-cm con un elettroporatore Gene Pulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) utilizzando un protocollo single-pulse (voltage 250 mV and Capacitance 1050 μ F). A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state trattate con PD+ATO per 24, 48 e 72 ore per la valutazione dell'apoptosi. 48 ore dopo la trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate per verificare tramite western blot l'avvenuto silenziamento dell'espressione proteica.

3.6 Western blot e anticorpi

Le cellule trattate vengono subito lisate in tampone di lisi: 50 mM Tris-HCl pH 8, 1.5mM MgCl₂, 150mM NaCl, 5mM EGTA pH 7.5, 5% (v/v) glicerolo, 1% (v/v) TritonX-100 a cui vengono aggiunti al momento inibitori delle proteasi 2µg/ml Aprotinina, 2µg/ml Leupeptina, 1µg/ml Pepstatina, 1mM phenylmethyl sulphonyl fluoride), 1mM ortovanadato di sodio, 50mM NaF. Il materiale insolubile viene rimosso tramite centrifugazione per 10 minuti a 12000 g a 4°C e la concentrazione del lisato è determinata mediante saggio proteico Bio-Rad. 100µg di lisato proteico sono stati poi caricati su gel SDS-PAGE (15%) per la corsa elettroforetica. Dopo l'elettroforesi le proteine vengono trasferite su filtro PVDF (Polyvinylidene difluoride) (Millipore Intertech, Bedford, MA, USA) e marcato con specifici anticorpi.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: rabbit polyclonal anti-Phospho-p44/42 ERK (Thr202/Tyr204), rabbit polyclonal anti phospho-CrkL (Tyr207), rabbit polyclonal anti-PUMA, rabbit polyclonal anti-Bax, rabbit polyclonal anti-Cleaved Caspase-3 da Cell Signaling Technology; mouse monoclonal anti-p73 (clone 1288) e mouse monoclonal anti ΔNp73 (clone 38C674) da Imgenex, Inc, San Diego, CA; mouse monoclonal anti c-Abl e goat polyclonal anti-human actin da Santa Cruz Biotechnology; rabbit polyclonal anti p53AIP1 da Anaspec, San Jose, CA. Sono stati usati i seguenti anticorpi secondari: goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugated (Bio-Rad); goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugated (Bio-Rad); donkey anti-goat IgG (H+L)-HRP conjugated (Santa Cruz Biotechnology).

Le bande ottenute dalla marcatura con TAp73 e ΔNp73 sono state sottoposte a scanner densitometrico utilizzando il software TINA2 (Raytest Isotopenmessgerate, Staubenhardt, Germany) e normalizzate rispetto all'actina; è stata poi calcolata la ratio tra le proteine TAp73(α+β)/ΔNp73.

3.7 Studio in vivo

Per lo studio in vivo sono stati utilizzati topi non-obese diabetic (NOD)/severe combined immunodeficient (SCID) CB17/Prkdcscid/J (NOD/SCID) provenienti da The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) di circa 5 settimane e mantenuti sotto le stesse condizioni ambientali controllate di sterilità durante tutta la sperimentazione. Il protocollo di sperimentazione in vivo è stato condotto presso il dipartimento Animali da Laboratorio

dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" di Brescia conformemente alle leggi nazionali ed internazionali ed approvato dal comitato etico dell'Università di Parma.

-Modello leucemico murino

Per lo studio del modello leucemico in vivo è stata utilizzata la linea Ba/F3p210^{T315I} altamente resistente ad Imatinib. 4×10^6 cellule sono state iniettate endovena nella vena caudale dell'animale pre-riscaldato a 37°C per 2 minuti. 5 giorni dopo l'inoculo i topi sono stati assegnati random nei diversi gruppi di trattamento (n=6 per gruppo) per ricevere i farmaci per tre settimane.

PD0325901 è stato formulato in 0.5% di idrossipropilmetilcellulosa (HPMC con viscosità di 4000 centipoise) con 0.2% di Tween 80, e somministrato per via orale a 10 mg/kg.

Il Triossido di Arsenico solido ultrapuro (As₂O₃) (Sigma, St. Louis, MO) è stato disciolto in una soluzione 1M di NaOH e poi diluito in PBS. La soluzione di ATO è stata poi titolata con HCl a pH 7.4, filtrata con filtri Costar da 0.22 µm (Santa Clara, CA) e diluita in PBS alla concentrazione stock di 0.5 mg/ml. La soluzione di ATO è stata somministrata per iniezione intraperitoneale alla dose di 3.75 mg/Kg²³.

Imatinib è stato disciolto in acqua sterile e somministrato intraperitonealmente a 50 mg/kg due volte al giorno.

I topi di controllo hanno ricevuto un'iniezione giornaliera di PBS (veicolo). Nei topi trattati con la combinazione, il PD0325901 è stato somministrato 6 ore prima dell'ATO. I topi hanno ricevuto il trattamento farmacologico per 5 giorni alla settimana per tre settimane.

I topi sono stati controllati ogni giorno per perdita di peso e benessere. Al ventesimo giorno dall'inoculo o quando i topi presentavano grave malessere, 3 topi per gruppo sono stati soppressi mediante dislocazione cervicale ed è stata fatta l'autopsia; gli organi sono stati asportati, fegato e milza sono stati fotografati e pesati, così come i possibili tumori solidi e il femore destro. Il materiale prelevato in sede autoptica è stato sottoposto in parte ad analisi istomorfologiche e saggi immunohistochimici mediante fissazione in formaldeide ed in parte sottoposto a Western Blot. Per la preparazione dei lisati proteici il materiale è stato omogenato in buffer di lisi e poi processato come descritto precedentemente.

-Analisi istologiche e immunoistochimiche

Le autopsie sono state fatte su tutti i soggetti e sono stati prelevati organi splanchnici, midollo osseo dal femore e campioni di neoplasie ove presenti, che sono stati fissati in formalina. Dai campioni fissati sono state ottenute sezioni di 0.5 μm di spessore che sono state processate per la colorazione con ematossilina-eosina (H&E) per la valutazione morfologica degli organi e il grado di infiltrazione neoplastica nei tessuti.

Come marker di proliferazione cellulare neoplastica è stata valutata l'espressione della proteina nucleare Ki67 in immunoistochimica (IHC) utilizzando un anticorpo monoclonale anti-Ki67 come da protocollo (NCL-L-Ki67-MM1, Novo Castra, Newcastle upon Tyne, UK) e sviluppato tramite complesso avidina-biotina (metodo ABC).

3.8 Analisi statistica

Per l'analisi statistica della varianza delle misurazioni ripetute è stato usato il test di Dunnett utilizzando il software JMP 7.0 (SAS Institute, Cary, NC).

Per la misurazione dell'effetto sinergico, additivo o antagonista è stato usato il metodo di Chou-Talalay e il software CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO). Brevemente, le cellule sono state stimulate con dosi scalari di PD (0.1-10 μM), ATO (0.125-10 μM) e la combinazione PD+ATO in rapporto fisso 1:1 (0.25/0.25, 0.5/0.5, 1/1, 1.5/1.5, 2/2, 5/5). Dopo 24 ore è stata valutata l'apoptosi con propidio iodido, annexin-V e MitoLight ed è stata determinata la curva dose-risposta per ogni farmaco da solo in combinazione usando il principio della mediana. È stato quindi calcolato l'indice di combinazione CI (Combination Index) con la seguente equazione: $CI = (Ac/As) + (Bc/Bs) + (Ac \times Bc)/(As \times Bs)$ dove (Ac) e (Bc) corrispondono alle concentrazioni dei composti A e B che hanno un effetto x quando usati in combinazione e (As) e (Bs) corrispondono alle concentrazioni dei composti A e B capaci di produrre da soli lo stesso effetto x . Con $CI < 1$ si ha un effetto sinergico, con $CI = 1$ si ha un effetto additivo, con $CI > 1$ si ha un effetto antagonista nell'induzione dell'apoptosi.

Le curve di sopravvivenza dello studio in vivo sono state elaborate con metodo di Kaplan-Meier e comparate utilizzando il test log-rank; i valori ottenuti dal test log-rank sono stati corretti con il metodo di Bonferroni per i confronti multipli (JMP software).

4. RISULTATI

4.1 L'inibizione di MEK potenzia l'effetto citotossico dell'ATO in linee cellulari di LMC Imatinib-resistenti.

Come prima cosa abbiamo valutato l'effetto citotossico del trattamento combinato PD+ATO in linee cellulari murine Ba/F3 che esprimevano la proteina Bcr-Abl wild-type (Ba/F3p210^{wt}) o con le mutazioni di Bcr-Abl T315I (Ba/F3p210^{T315I}, alta resistenza all'Imatinib) e Y253F (Ba/F3p210^{Y253F}, media resistenza all'Imatinib)^{31,34}. Le cellule sono state preincubate con il veicolo (DMSO) o con gli inibitori di MEK (PD184352 a 1 μ M o PD0325901 a 0.2 μ M) per 3 ore dopo le quali è stato aggiunto l'ATO a 1 e 2 μ M. Dopo 24 ore e 48 ore di trattamento le cellule sono state raccolte e sottoposte a valutazione citofluorimetrica dell'apoptosi utilizzando la colorazione con ioduro di propidio e/o con annexina V. Abbiamo così osservato che il trattamento con PD aumentava significativamente l'effetto citotossico indotto dall'ATO in tutte le linee testate (figura 4A e 4Bi-ii).

Figura 4

A

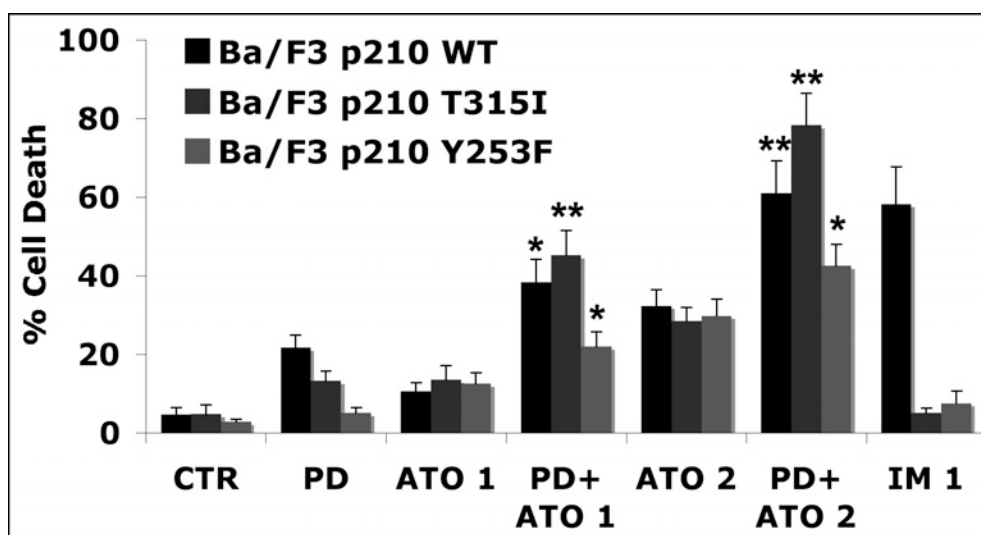


Figura 4 B

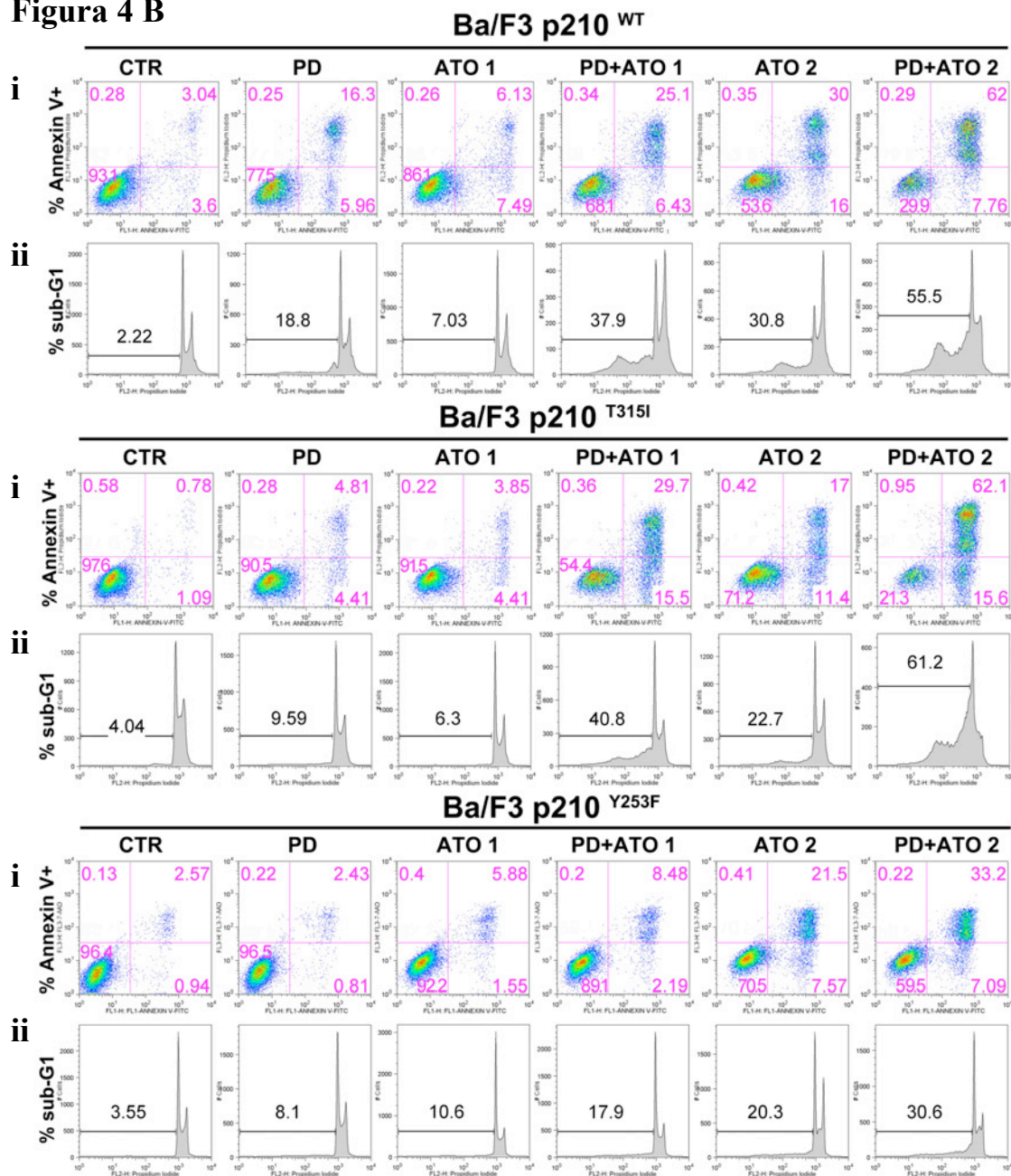


Figura 4. L'inibizione di MEK potenzia l'effetto citotossico dell'ATO in linee cellulari Ba/F3 Bcr-Abl+. (A) Le cellule Ba/F3p210^{wt}, Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{Y253F} sono state seminate alla concentrazione di 10⁵ cells/mL in presenza di veicolo (DMSO) o PD184352 (1 μ M) e poi trattate con ATO 1 μ M e 2 μ M. Le cellule sono state trattate con Imatinib (IM; 1 μ M) come controllo della resistenza. Dopo 24 ore di trattamento è stata valutata la citotossicità mediante colorazione con Annexina-V e valutazione citofluorimetrica. Nell'istogramma sono riportati i valori della media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (*P < .05, **P < .005 contro i trattamenti in singolo, test di Dunnett). (B) Sono riportati esperimenti rappresentativi effettuati sulle linee cellulari Ba/F3p210^{wt}, Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{Y253F} valutate al citofluorimetro dopo 24 ore di trattamento PD+ATO mediante metodica dell'annexina-V/PI (i) e ciclo cellulare (sub-G1 DNA content) (ii).

Al fine di valutare l'interazione farmacologica tra i due composti sono stati effettuati esperimenti utilizzando dosi scalari di PD184352 e ATO da soli o in combinazione con ratio fissa 1:1 nelle linee cellulari Ba/F3p210^{WT}, Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{Y253F}. Abbiamo così dimostrato, mediante test statistico (metodo di Chou-Talalay) che il trattamento combinato PD184352+ATO risultava in un'induzione dell'apoptosi in modo sinergico in tutte le linee testate (Combination Index CI<1) (Figura 5). Il valore di CI medio per ogni linea cellulare è stato calcolato dall'ED50 (Effective Dose 50, definita come la quantità di farmaco necessaria per ottenere un effetto desiderato sul 50 per cento del campione trattato), dall'ED75 e dell'ED90 della combinazione PD+ATO e sono riportati nella tabella seguente:

Tabella 1

Cell line	Mean CI ± SD
Ba/F3p210 ^{WT}	0.72±0.19
Ba/F3p210 ^{T315I}	0.61±0.04
Ba/F3p210 ^{Y253F}	0.69±0.09

Tabella 1. Le cellule sono state seminate in presenza di dosi scalari di PD184352 (0.1-10 µM), ATO (0.125-10 µM) o con la combinazione PD+ATO in rapporto fisso 1:1 (0.25/0.25, 0.5/0.5, 1/1, 1.5/1.5, 2/2/, 5/5 µM). Dopo 24 ore è stata valutata l'apoptosi con annexin-V e propidio iodido, ed è stata determinata la curva dose-risposta della combinazione PD+ATO. I valori di CI medio sono stati calcolati a partire dall'ED50, ED75 ed ED90 utilizzando il metodo dell'Effetto Mediano di Chou.

Figura 5

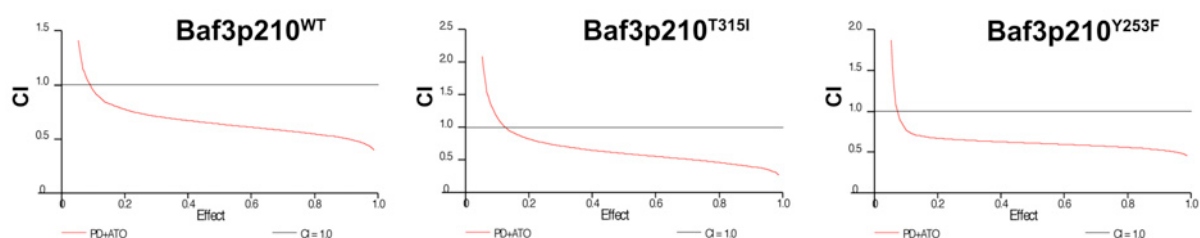


Figura 5. Effetto sinergico della combinazione PD184352+ATO in linee cellulari Ba/F3 Bcr-Abl+. Le cellule Ba/F3p210^{WT}, Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{Y253F} sono state seminate alla concentrazione di 10⁵ cells/mL in presenza di veicolo (DMSO) o di dosi scalari di PD184352 (0.1-10 µM), ATO (0.125-10 µM) o con la combinazione PD+ATO in rapporto fisso 1:1 (0.25/0.25, 0.5/0.5, 1/1, 1.5/1.5, 2/2/, 5/5 µM). Dopo 24 ore è stata valutata l'apoptosi con annexin-V e propidio iodido, ed è stata determinata la curva dose-risposta per ogni farmaco da solo in combinazione usando il principio della mediana. È stato quindi calcolato l'indice di combinazione CI (Combination Index). Con CI<1 si ha un effetto sinergico, con CI=1 si ha un effetto additivo, con CI >1 si ha un effetto antagonista nell'induzione dell'apoptosi.

Abbiamo inoltre osservato un'interazione sinergica tra ATO e PD0325901 in tutte le linee testate paragonabile a quella osservata con ATO e PD184352 (dati non mostrati). Inoltre, anche nelle linee cellulari K562-RES e LAMA84-RES che mostrano un meccanismo di resistenza non legato a mutazioni puntiformi di Bcr-Abl, è stato osservato che il PD aumentava significativamente l'apoptosi indotta dall'ATO (Figura 6).

Figura 6

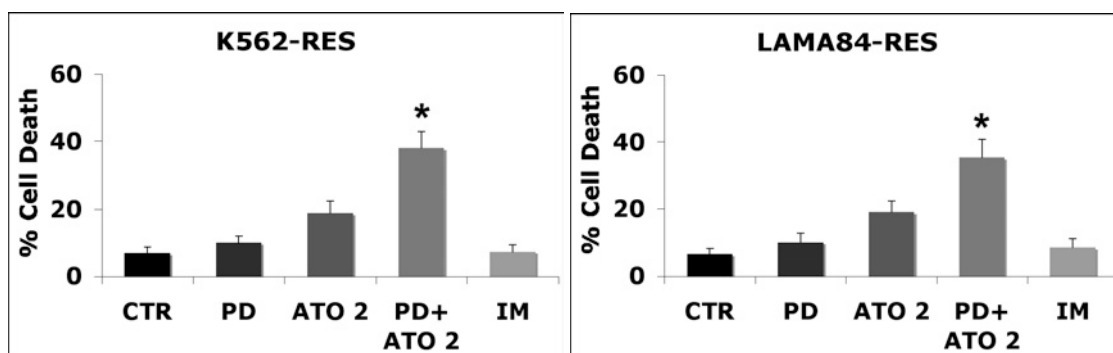


Figura 6. L'inibizione di MEK potenzia l'effetto citotossico dell'ATO in linee cellulari Bcr-Abl+. Le cellule K562-RES e LAMA84-RES sono state seminate alla concentrazione di 10^5 cells/mL in presenza di veicolo (DMSO) o PD184352 (1 μ M) e poi trattate con ATO 2 μ M. Le cellule sono state trattate con Imatinib (IM; 1 μ M) come controllo della resistenza. Dopo 48 ore di trattamento è stata valutata la citotossicità mediante colorazione con Annexina-V e valutazione citofluorimetrica. Nell'istogramma sono riportati i valori della media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (* $P < .01$ contro i trattamenti in singolo, test di Dunnett).

4.2 Il trattamento combinato PD+ATO promuove una degradazione dell'oncoproteina Bcr-Abl in cellule Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{WT}.

Data la rilevanza biologica della mutazione T315I e l'efficacia della combinazione PD+ATO che abbiamo osservato nella linea cellulare portatrice di questa alterazione, abbiamo concentrato i nostri studi molecolari sulle due linee Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{WT}.

Come prima cosa siamo andati a verificare l'efficacia dell'inibizione di MEK attraverso l'analisi della fosforilazione del suo substrato ERK1/2. Come aspettato il trattamento con PD portava ad un'inibizione della fosforilazione di ERK1/2 (Figura 7A). Molto interessante, abbiamo anche osservato che la linea Ba/F3p210^{T315I}, a differenza della p210^{WT}, presentava basalmente una fosforilazione più accentuata di ERK1/2, e che il trattamento con ATO portava ad un aumento di questa attività fosforilativa, come già

precedentemente dimostrato in cellule di leucemia acuta²¹, lasciando dunque supporre che questa linea cellulare utilizza questa via per resistere all'azione dell'ATO.

In seguito siamo andati a studiare se il trattamento combinato influenzava l'espressione dell'oncoproteina Bcr-Abl, ed abbiamo così osservato che il trattamento con PD bloccava l'accumulo di Bcr-Abl indotto dall'ATO. Coerentemente con questo risultato abbiamo osservato che ad un aumento dell'espressione ATO-indotta di Bcr-Abl corrispondeva un aumento dell'attivazione/fosforilazione della proteina CrkL, substrato riconosciuto dell'attività di Bcr-Abl, e il trattamento con PD bloccava questa induzione (Figura 7B). Questo fenomeno era molto evidente a tempi tardivi, ovvero a 48 ore di trattamento. Questo dato molecolare preliminare suggerisce che il trattamento combinato PD+ATO modula negativamente l'attività chinasi di Bcr-Abl.

Figura 7

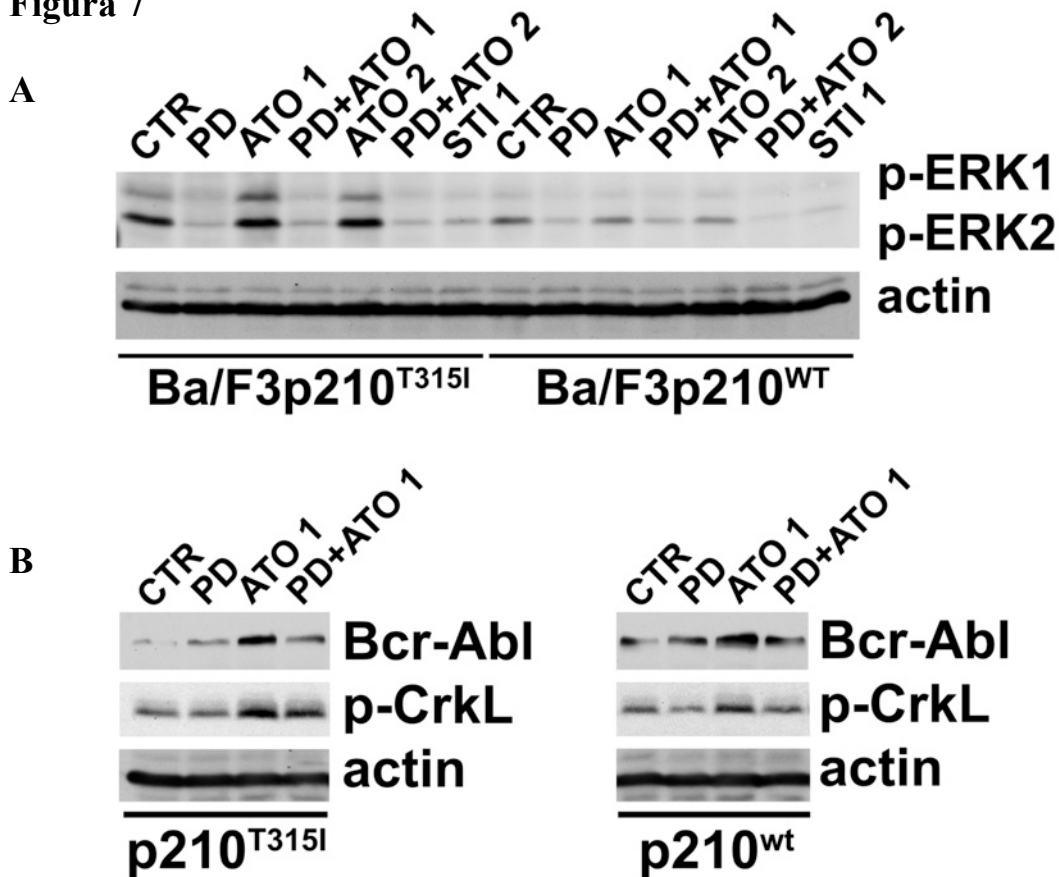


Figura 7. Il trattamento combinato PD+ATO riduce l'attività chinasi di Bcr-Abl. (A) Le cellule sono state seminate a 10^5 cells/mL in presenza di DMSO (veicolo) o PD184352 ($1 \mu\text{M}$) per tre ore e poi incubate con ATO ($1 \mu\text{M}$ e $2 \mu\text{M}$). Le cellule sono state stimolate anche con Imatinib $1 \mu\text{M}$ come controllo. Dopo 24 ore di trattamento le cellule sono state raccolte e lisate per monitorare la fosforilazione di ERK1/2 e l'espressione dell'actina come controllo di caricamento. (B) Le cellule sono state stimolate come sopra e dopo 48 ore sono state raccolte e lisate per monitorare l'espressione di Bcr-Abl, la fosforilazione di CrkL e l'espressione dell'actina come controllo di caricamento.

4.3 Il trattamento combinato attiva la pathway di p73 nelle linee cellulari Ba/F3 Imatinib-sensibili e -resistenti.

Come precedentemente riportato da Lunghi et al^{20,22}, l'inibizione della via di segnalazione MEK/ERK portava ad un potenziamento dell'effetto citotossico dell'ATO in blasti primari di Leucemia Acuta Mieloide (LAM) attraverso l'attivazione delle pathway proapoptotiche mediate dalle proteine della famiglia di p53/p73. La p73 è una proteina con struttura e funzionalità omologhi alla proteina p53 che interviene nella regolazione di molti meccanismi anti-tumorali, come la riparazione del DNA danneggiato, il blocco della proliferazione cellulare e l'induzione dell'apoptosi. La p73 è presente in due isoforme trascritte da due promotori alternativi: TAp73 (con dominio di Trans Attivazione) che ha funzione proapoptotica e antiproliferativa, e le isoforme più studiate sono la TAp73 α e la TAp73 β ; Δ Np73 (mancante del dominio di Trans Attivazione) con funzione antiapoptotica e proproliferativa; questa isoforma ha effetto di dominante negativo sia sulla TAp73 che sulla p53, e un'aumentata espressione di Δ Np73, piuttosto che mutazioni inattivanti la TAp73, è stata associata a sviluppo tumorale^{40,41}.

È stato riportato da Lunghi et al^{20,21,22} che in cellule di leucemia l'inibizione di MEK portava ad una diminuzione dei livelli di Δ Np73 e ad una fosforilazione e stabilizzazione di TAp73, che si traduce in una up-regolazione di geni coinvolti nel ciclo cellulare come p21. Il trattamento con ATO portava anch'esso ad una down-regolazione di Δ Np73, ma in più aumentava l'acetilazione di TAp73 ad opera dell'acetyl-transferase p300; TAp73 acetilata è in grado di up-regolare geni proapoptotici come PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) e BAX (Bcl-2-associated X protein)⁴². Il trattamento combinato PD+ATO oltre a down-regolare la Δ Np73, portava ad un accumulo di TAp73 fosfo-acetilata, con un aumento dell'affinità verso il promotore della proteina proapoptotica target di p53 p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1), che si localizza nel mitocondrio e la sua espressione induce una massiva morte cellulare attraverso alterazione della membrana mitocondriale^{20,22,43,44}.

Siamo dunque andati a studiare il comportamento di queste proteine in seguito a trattamento combinato nelle cellule di LMC Ba/F3p210^{WT} e p210^{T315I}.

In entrambe le linee abbiamo osservato che il trattamento combinato PD+ATO promuoveva un accumulo delle due isoforme proapoptotiche TAp73 α e TAp73 β PD-mediato e ad una riduzione dei livelli dell'isoforma antiapoptotica Δ Np73 ATO-mediata (Figura 8A). Dato che la modulazione del bilanciamento di queste due proteine a favore dell'isoforma proapoptotica TAp73 può contribuire alla suscettibilità delle cellule tumorali alla risposta verso farmaci citotossici e/o citostatici, le bande ottenute dal western blot sono state sottoposte a studio densitometrico per una quantificazione relativa delle due isoforme e abbiamo calcolato la ratio TAp73(α + β)/ Δ Np73. Abbiamo potuto così osservare che in entrambe le linee cellulari Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{WT} il trattamento combinato PD+ATO portava ad un rilevante aumento della ratio TAp73(α + β)/ Δ Np73 rispetto ai singoli trattamenti, di circa 3 volte rispetto al PD e 1.5 volte rispetto all'ATO (Figura 8B), anche nella linea Ba/F3p210^{WT}, che già basalmente presentavano una maggior espressione della Δ Np73 (Figura 8A). Abbiamo inoltre osservato nelle Ba/F3p210^{WT} che il trattamento con Imatinib portava ad una forte down-regolazione della Δ Np73 rispetto al controllo, che si traduceva in un aumento della ratio TAp73(α + β)/ Δ Np73 di 2.5 volte rispetto al non trattato. Al contrario nelle cellule Ba/F3p210^{T315I} abbiamo osservato che questa proteina veniva blandamente up-regolata dall'Imatinib rispetto al controllo, mantenendo bassa la ratio TAp73(α + β)/ Δ Np73.

Figura 8

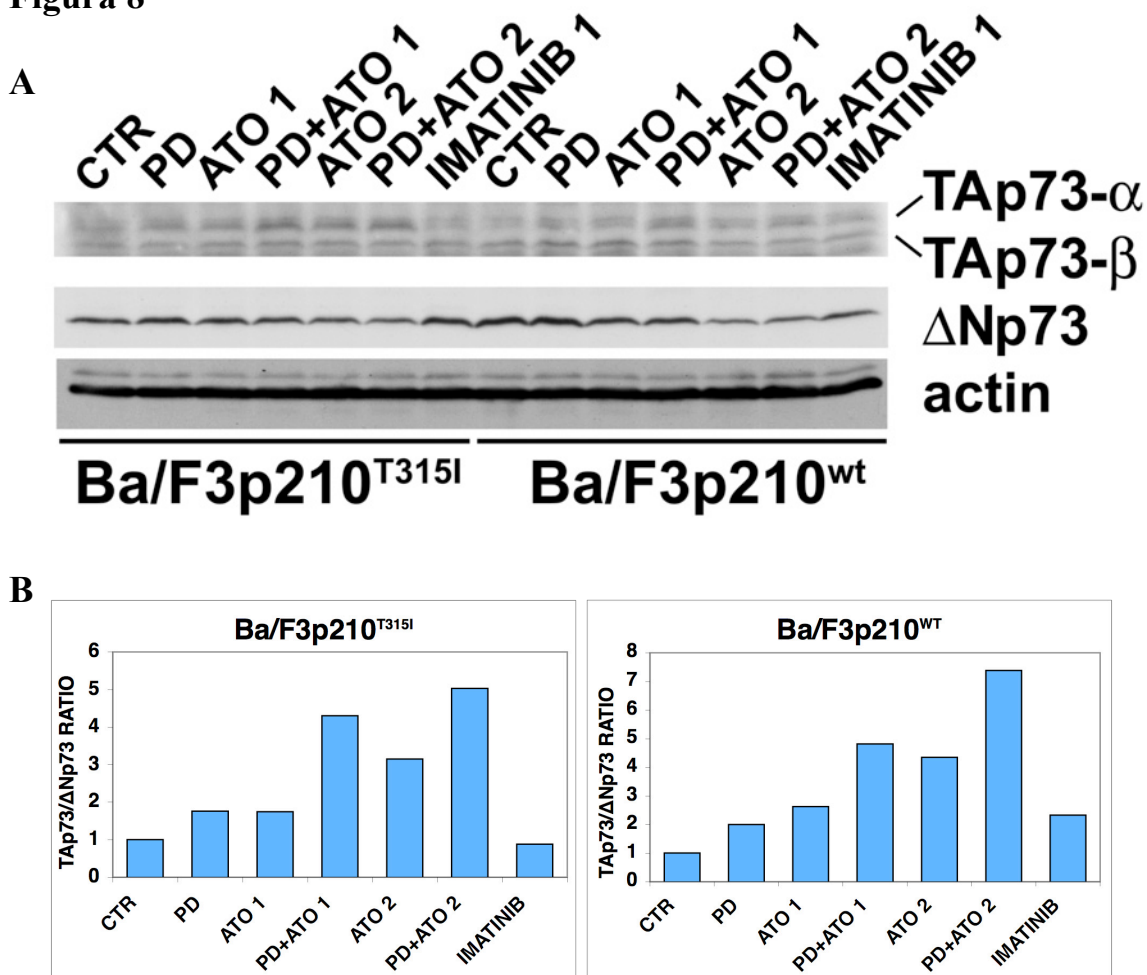


Figura 8. Il trattamento combinato PD+ATO aumentava fortemente la ratio TAp73/ΔNp73 nelle linee cellulari Ba/F3 Bcr-Abl+. (A) Le cellule sono state seminate a 10^5 cells/mL in presenza di DMSO (veicolo) o PD0235901 ($0.25 \mu\text{M}$) per tre ore e poi incubate con ATO ($1 \mu\text{M}$ e $2 \mu\text{M}$). Le cellule sono state stimolate anche con Imatinib $1 \mu\text{M}$ come controllo. Dopo 24 ore di trattamento le cellule sono state raccolte e lisate per monitorare l'espressione delle proteine TAp73 α , TAp73 β , ΔNp73 e actina come controllo di caricamento. (B) Le bande delle proteine TAp73 α , TAp73 β e ΔNp73 ottenute dall'immunoblot sono state sottoposte ad analisi densitometrica e normalizzate rispetto all'actina. Gli istogrammi rappresentano la ratio TAp73($\alpha+\beta$)/ΔNp73 per ogni trattamento normalizzata rispetto al valore del controllo non trattato.

Il forte sbilanciamento dell'equilibrio TAp73/ΔNp73 a favore dell'isoforma TAp73 osservata nel trattamento combinato PD+ATO si traduce in una più pronunciata espressione di geni proapoptotici target di p73 e di conseguenza ad un'alterazione perdita della funzionalità mitocondriale, come abbiamo poi osservato in entrambe le due linee Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{wt} mediante la misurazione della perdita di potenziale di membrana mitocondriale, indice dell'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi (Figura 9).

Figura 9

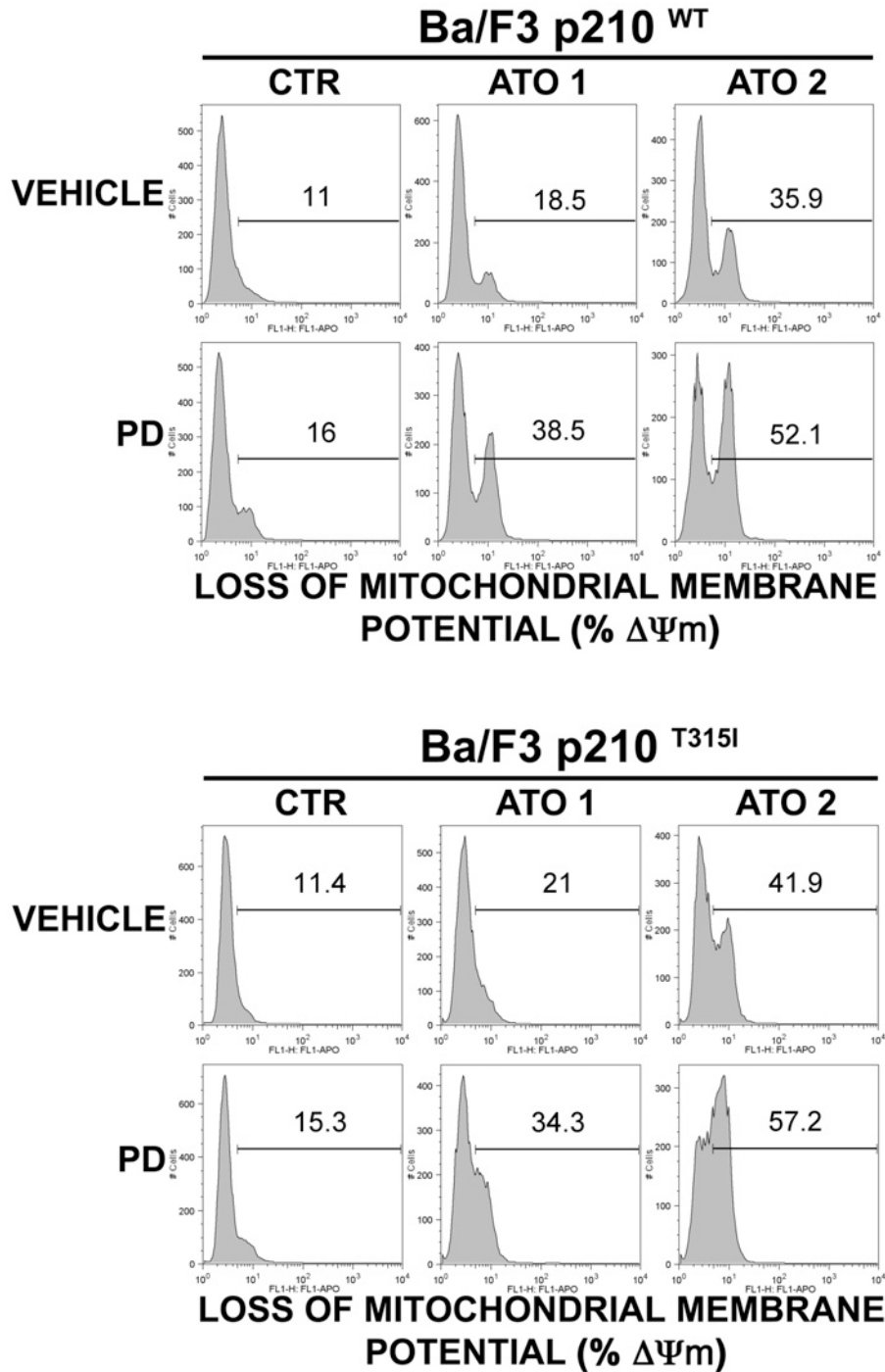


Figura 9. L'inibizione di MEK aumenta la perdita del potenziale di membrana mitocondriale indotta dall'ATO. Le cellule sono state preincubate per tre ore con PD e poi trattate con ATO alle dosi indicate. È stata poi valutata la perdita del potenziale di membrana mitocondriale mediante marcatura al citofluorimetro. Il valore indicato nei plots rappresenta la perdita del potenziale di membrana mitocondriale in percentuale % misurato a 48 ore dalla stimolazione.

Dato che il trattamento combinato porta ad uno sbilanciamento delle isoforme della p73 e ad un aumento della perdita del potenziale di membrana mitocondriale, siamo andati a vedere in che modo il trattamento combinato si rifletteva sull'espressione delle proteine proapoptotiche target molecolari di p73 come PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) e BAX (Bcl-2-associated X protein) della Bcl-2 family e di p53AIP1, tutte proteine coinvolte nell'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi²⁰⁻²³.

A 24 ore di trattamento abbiamo osservato in entrambe le linee Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{wt} che il trattamento con PD non aumentava significativamente l'espressione di PUMA indotta dall'ATO sia ad alte che a basse dosi (Figura 10A), mentre abbiamo osservato un forte aumento indotto dalla combinazione PD+ATO 1 nelle Ba/F3p210^{wt} a 48 ore dalla stimolazione (Figura 10B).

Inoltre non abbiamo osservato modulazioni rilevanti nell'espressione di BAX nei diversi trattamenti in entrambe le linee (Figura 10A).

Molto interessante invece, abbiamo osservato che il trattamento con PD+ATO portava ad un accumulo della proteina p53AIP1 nelle Ba/F3p210^{T315I} sia ad alte che a basse dosi, mentre nelle Ba/F3p210^{wt} solo dopo trattamento con PD+ATO a basse dosi ed in modo meno marcato (Figura 10A). L'aumento di questa potente proteina proapoptotica causa alterazione della membrana mitocondriale e porta al rilascio nel citoplasma di proteine apoptogeniche e di conseguenza porta al marcato clivaggio e attivazione della caspasi-3 (braccio effettore di entrambe le vie apoptotiche estrinseca ed intrinseca) osservata nel trattamento combinato PD+ATO (Figura 10Ci e Cii).

Questi dati molecolari confermano l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi indotta dal trattamento combinato e correlano bene con l'up-regolazione dei geni target di p73.

Figura 10

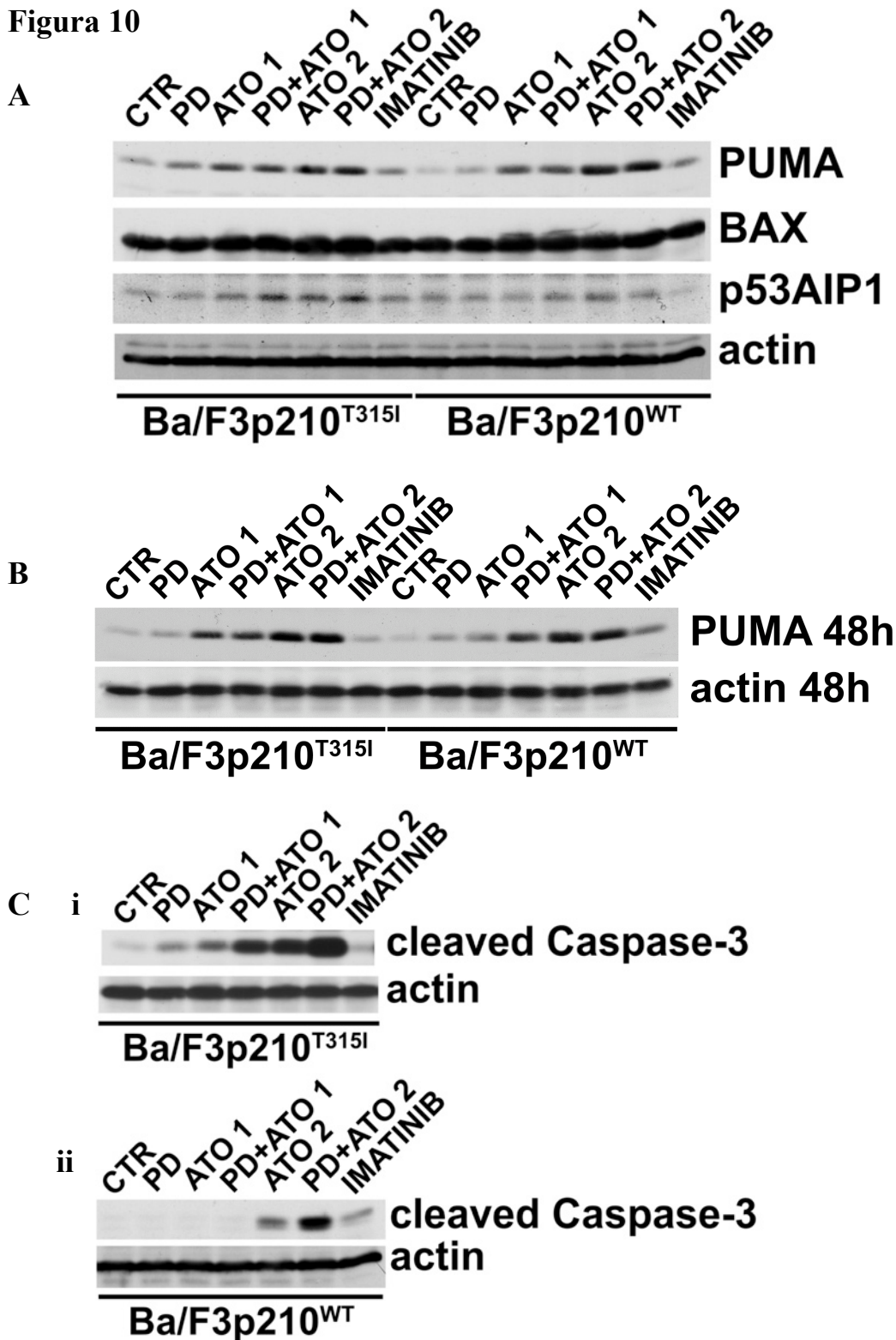


Figura 10. Il trattamento combinato PD+ATO up-regola le proteine coinvolte nella via intrinseca dell'apoptosi. Le cellule sono state seminate a 10^5 cells/mL in presenza di DMSO (veicolo) o PD184352 (1 μ M) per tre ore e poi incubate con ATO (1 μ M e 2 μ M). Le cellule sono state stimolate anche con Imatinib 1 μ M come controllo. **(A)** Dopo 24 ore di trattamento le cellule sono state raccolte e lisate per monitorare l'espressione delle proteine PUMA, BAX, p53AIP1 e actina come controllo di caricamento. **(B)** Le cellule sono state trattate come sopra e dopo 48 ore è stata valutata l'espressione di PUMA e actina. **(C)** Dopo 24 ore di trattamento PD+ATO le cellule Ba/F3p210^{T315I} **(i)** e Ba/F3p210^{WT} **(ii)** sono state raccolte e lisate per monitorare il clivaggio e l'attivazione della caspasi-3 (cleaved caspase-3) e l'actina come controllo di caricamento.

4.4 Valutazione della rilevanza biologica della p73 nell'apoptosi indotta dal trattamento combinato in linee cellulari Ba/F3 Bcr-Abl+.

Al fine di confermare la rilevanza biologica della p73 in risposta al trattamento combinato PD+ATO abbiamo effettuato uno studio funzionale attraverso silenziamento dell'espressione endogena della TAp73 e della Δ Np73 mediante trasfezione con specifici siRNA (small interfering RNA) nella linea cellulare Ba/F3p210^{T315I}.

Abbiamo così osservato che la trasfezione portava ad un potente silenziamento di entrambe le proteine (Figura 11A), e che il silenziamento della TAp73 inibiva significativamente l'apoptosi indotta dalla combinazione ($P < .05$ Dunnett test) (Figura 11B); al contrario il silenziamento della Δ Np73 portava ad un significativo potenziamento dell'apoptosi indotta da PD+ATO ($P < .05$ Dunnett test) (Figura 11B). Inoltre visto il ruolo della Δ Np73 di dominante negativo sull'espressione di TAp73, abbiamo inoltre osservato che il suo silenziamento portava ad un marcato aumento della perdita del potenziale di membrana mitocondriale (Figura 11C), indice di una più potente attivazione della via intrinseca dell'apoptosi mediata dalle proteine target della TAp73.

Figura 11

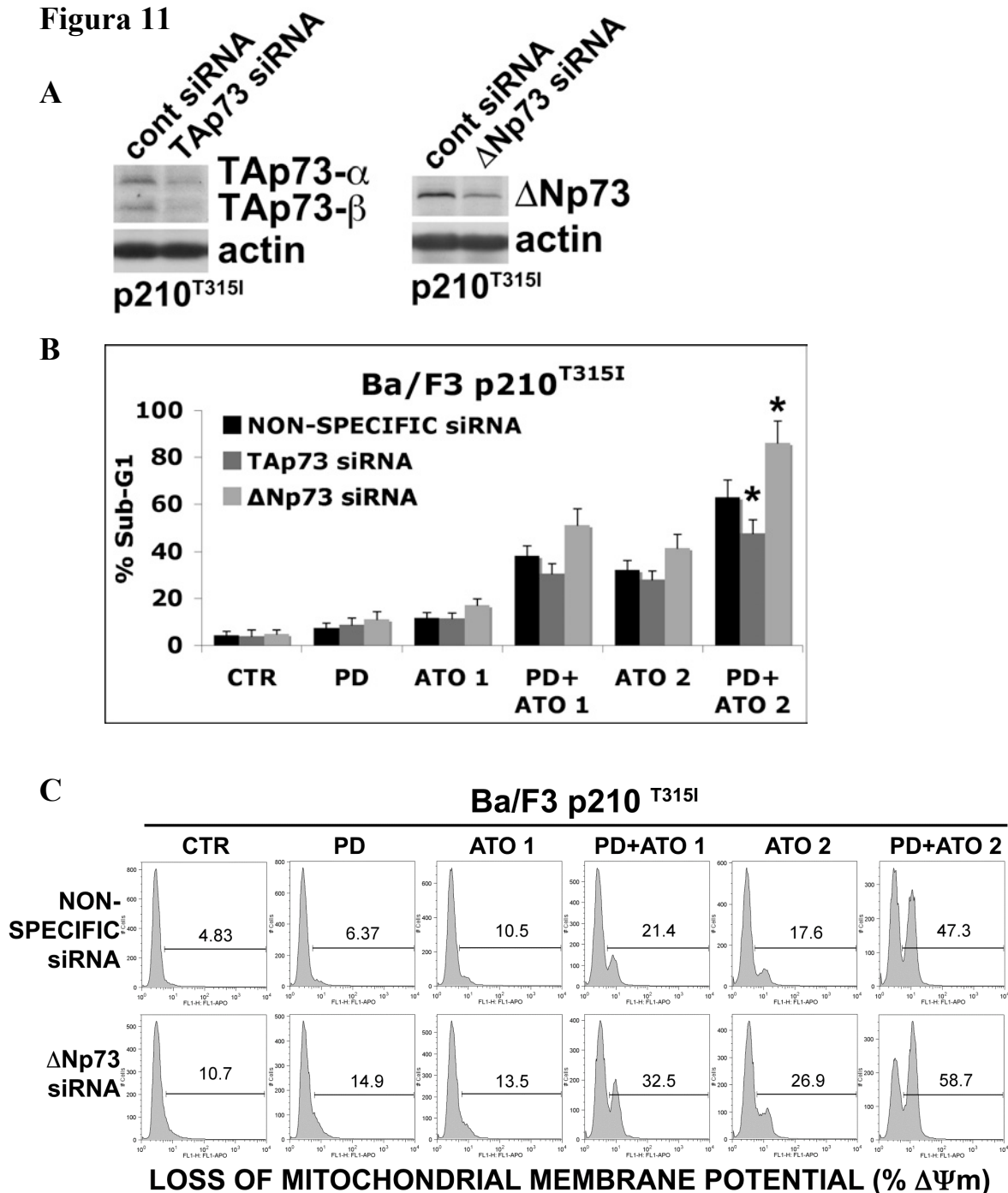


Figura 11. Ruolo biologico di TAp73 e ΔNp73 nell'apoptosi indotta dalla combinazione PD+ATO in linee cellulari Ba/F3p210^{T315I}. 10⁷ cellule Ba/F3 p210^{WT} e p210^{T315I} sono state trasfettate con 2 nmol di siRNA anti ΔNp73 o con 2 nmol di siRNA anti TAp73 o con siRNA non specifico (cont). **(A)** 48 ore dopo la trasfezione le cellule sono state raccolte per la valutazione del silenziamento tramite western e immuno blot anti TAp73, ΔNp73 e actina come controllo di caricamento. **(B-C)** 24 ore dopo la trasfezione le cellule sono state stimolate con PD+ATO per 24 ore, dopo le quali è stata valutata: **(B)** l'apoptosi mediante valutazione citofluorimetrica del ciclo cellulare; nell'istogramma sono indicati i valori medi di % sub-G1 ± SD di tre esperimenti indipendenti (*P < .05 tra le condizioni PD+ATO siRNA ΔNp73 versus PD+ATO siRNA non specifico e tra le condizioni PD+ATO siRNA TAp73 versus PD+ATO siRNA non specifico, test di Dunnett); **(C)** la perdita del potenziale di membrana mitocondriale ΔΨ_m valutata al citofluorimetro; i valori riportati nei plots indicano il ΔΨ_m in percentuale di un esperimento rappresentativo di silenziamento della ΔNp73.

4.5 Valutazione dell'efficacia del trattamento combinato PD+ATO in un modello murino leucemico Imatinib-resistente.

Per determinare se l'efficacia della combinazione PD+ATO osservata in vitro era tale anche in vivo, abbiamo studiato l'effetto del PD+ATO in un modello leucemico murino Imatinib-resistente Bcr-Abl dipendente.

Topi NOD/SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient) sono stati inoculati mediante iniezione intravenosa con la linea cellulare Ba/F3p210^{T315I} altamente resistente all'Imatinib. I topi così ammalati di leucemia Bcr-Abl^{T315I} -indotta sono stati trattati con l'inibitore di MEK PD0325901 (10 mg/kg con somministrazione orale) o con ATO (3.75 mg/kg con somministrazione intraperitoneale) o con la combinazione PD+ATO o con Imatinib (due somministrazioni giornaliere intraperitoneali da 50 mg/kg) o con il veicolo (PBS) per una durata del trattamento di 5 giorni a settimana per tre settimane.

Dato che in questo modello murino le cellule leucemiche tendono a localizzarsi oltre che nel midollo osseo anche nel fegato e nella milza⁴⁵, siamo andati a valutare in che modo questi organi venissero coinvolti dalla malattia durante il trattamento farmacologico. Dall'analisi macroscopica di milza e fegato abbiamo osservato che il trattamento PD+ATO era in grado di mantenere le dimensioni e il peso paragonabili a quelle dei controllo negativi non ammalati, mentre i topi trattati con il Veicolo o con Imatinib o coi singoli farmaci presentavano un aumento variabile della dimensione di fegato e milza e presentavano numerose infiltrazioni neoplastiche, indice di un interessamento di questi organi nella progressione della malattia (Figura 12A e 12B).

Figura 12

A

Ba/F3p210^{T315I} 20th day

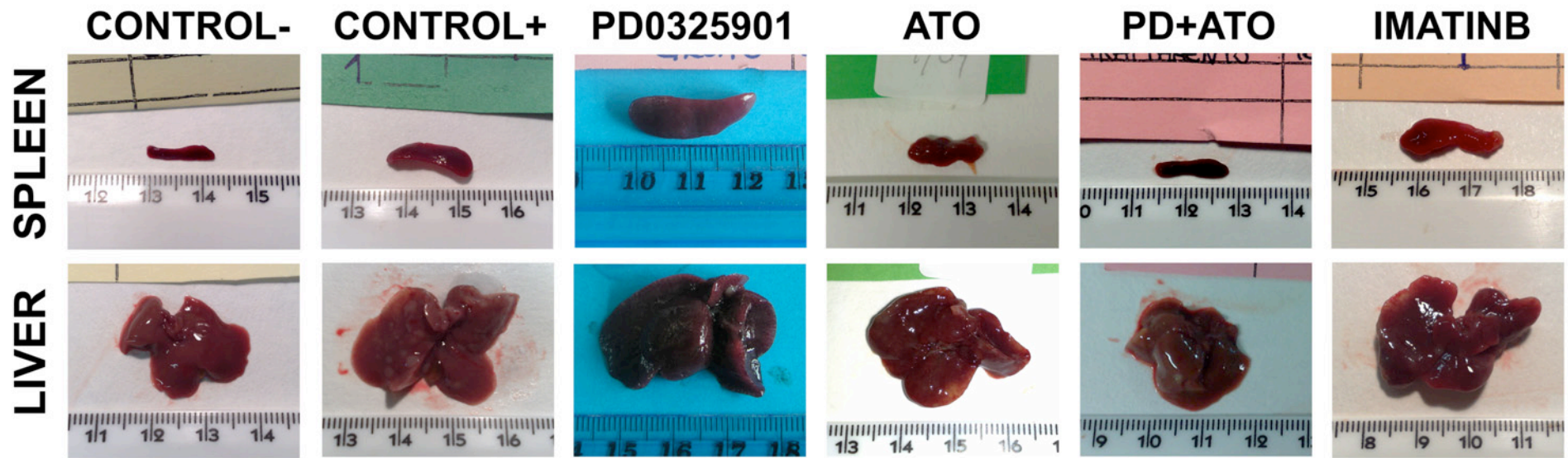


Figura 12 B

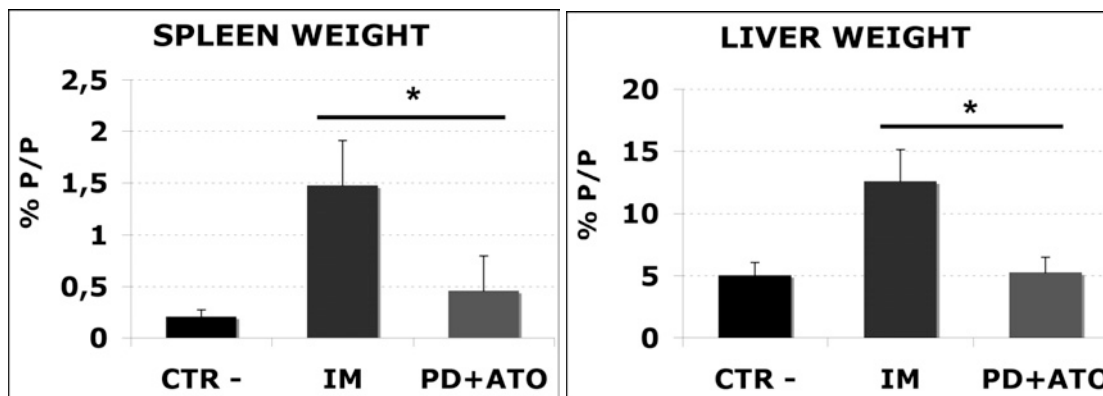


Figura 12. Il trattamento combinato PD+ATO inibisce la progressione della malattia in topi portatori della leucemia Bcr-Abl indotta Imatinib resistenti. (A) Le cellule Ba/F3p210^{T315} sono state iniettate nella vena caudale di topi NOD/SCID. A 5 giorni dall'iniezione i topi sono stati divisi random per ricevere i diversi trattamenti con i farmaci PD0325901 o ATO in singolo o in combinazione o Imatinib o Veicolo (Control+). Dopo 20 giorni dall'inoculo 3 animali per gruppo sono stati sacrificati, fegato e milza sono stati rimossi, pesati e fotografati. In figura sono riportati fegati e milze di un animale rappresentativo per ogni gruppo di trattamento. **(B) (i-ii)** Gli istogrammi riportati in figura rappresentano la media \pm SD dei pesi di milze **(i)** e fegati **(ii)** dei topi sacrificati durante il trattamento farmacologico con PD+ATO o Imatinib rapportato in % al peso dell'animale (% grammi milza/grammi topo o % grammi fegato/grammi topo) (* $P < .01$ tra il gruppo trattato con PD+ATO e Imatinib, test di Dunnett). CTR- indica il gruppo di topi non leucemici, IM indica Imatinib.

Dato che non vi erano differenze significative tra i topi trattati con il veicolo o coi farmaci in singolo o con Imatinib, abbiamo concentrato l'analisi istopatologica, immunohistochimica e molecolare sui gruppi di topi trattati con l'Imatinib o con la combinazione PD+ATO e sui topi di controllo non ammalati.

Coerentemente con l'aumento delle dimensioni di milza e fegato riportate in figura 12A, dall'analisi istopatologica effettuata a fine trattamento (20 giorni) fegati e milze dei topi trattati con Imatinib presentavano abbondanti infiltrazioni neoplastiche (Figura 13A), osservate sia dalla colorazione con ematossilina ed eosina sia mediante marcatura con Ki-67, marker di proliferazione. Parallelamente all'analisi immunohistochimica abbiamo inoltre osservato dallo studio delle proteine in western blot che i fegati e le milze dei topi trattati con Imatinib presentavano una più marcata espressione di Bcr-Abl rispetto ai topi trattati con PD+ATO (Figura 13Bi-ii), confermando la forte diminuzione di cellule neoplastiche Bcr-Abl+ negli organi analizzati.

Figura 13

A

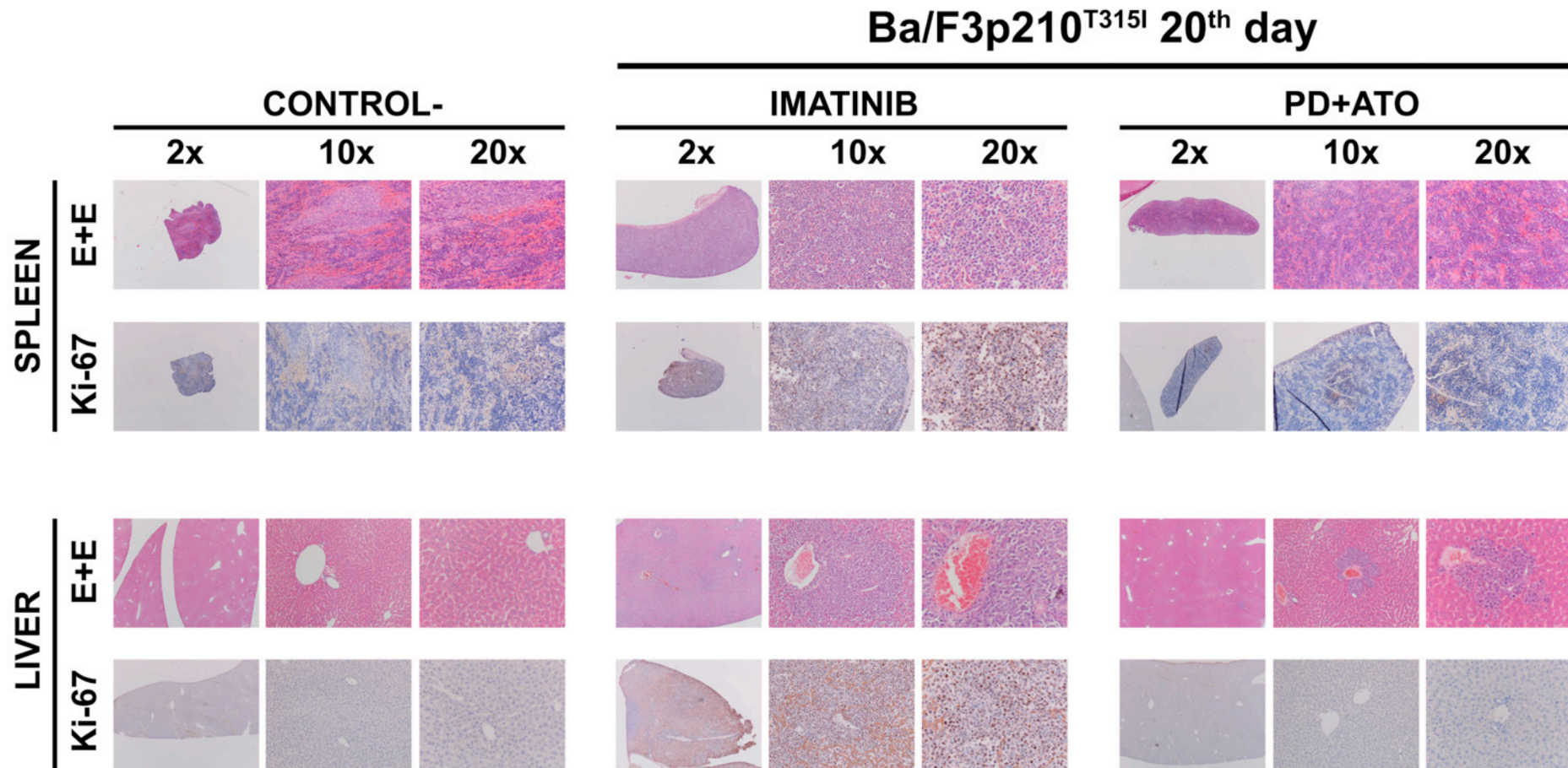


Figura 13 B

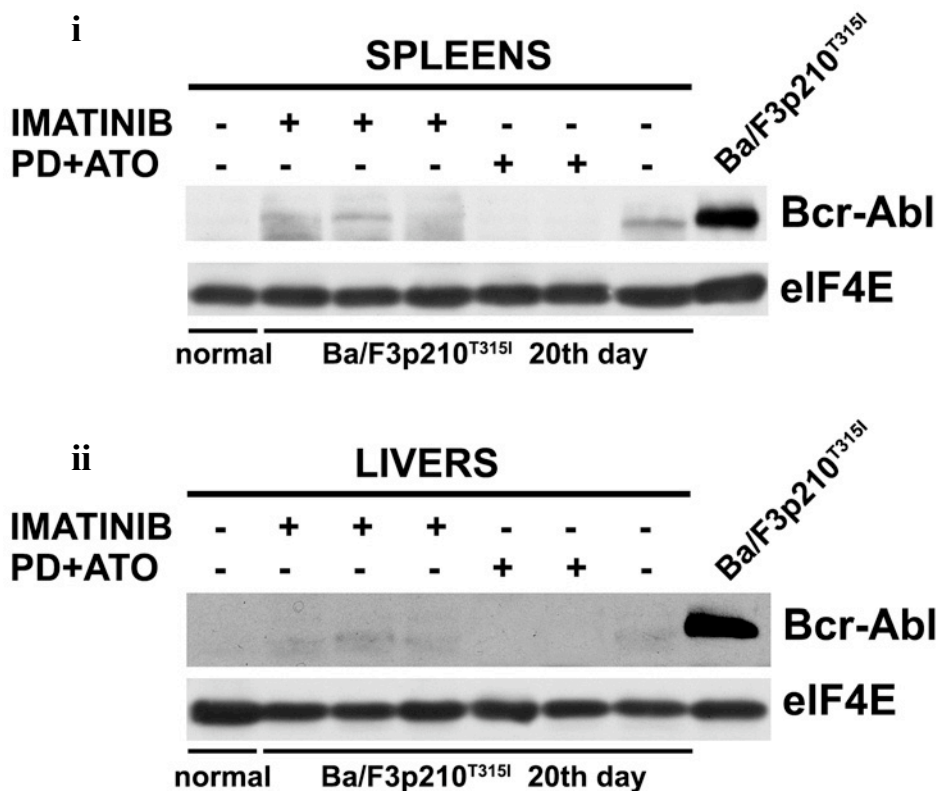


Figura 13. Il trattamento combinato PD+ATO inibisce l'infiltrazione di cellule leucemiche in fegato e milza dei topi leucemici. (A) I fegati e le milze dei topi trattati con Imatinib e PD+ATO sono stati prelevati a 20 giorni dall'inoculo e processati per l'analisi istopatologica mediante colorazione con ematosilina ed eosina (E+E) e per l'analisi immunohistochimica dell'espressione della proteina Ki-67. In figura sono riportate microfotografie ad ingrandimento 2x, 10x, e 20x di topi rappresentativi per ogni gruppo di trattamento. Come controllo negativo sono riportate le analisi di milza e fegato di un topo non leucemico (CONTROL-). (B) Parallelamente all'analisi riportata in (A), le milze (i) e i fegati (ii) sono stati processati per la valutazione delle proteine tramite western blot per monitorare i livelli di Bcr-Abl e di eIF4E come controllo di caricamento. Come controllo positivo è stato caricato il lisato proteico delle cellule Ba/F3p210^{T315I}.

La marcata inibizione dell'infiltrazione neoplastica in questi due organi, indice di un rallentamento della progressione della malattia, si è poi tradotta in un significativo aumento della sopravvivenza dei topi leucemici. Come riportato in Figura 14A, i topi trattati con Imatinib sviluppavano una malattia molto aggressiva che portava a morte dell'animale in media dopo 32 giorni (indice di confidenza CI=26-35). Al contrario i topi trattati con la combinazione PD+ATO mostravano una sopravvivenza media significativamente prolungata di 43 giorni (indice di confidenza CI=33-62) (P=.0018, metodo di Kaplan-Meier e comparazione con test log-rank). Inoltre abbiamo osservato che il trattamento combinato era ben tollerato in vivo e a fine trattamento (21giorni) non provocava una significativa perdita di peso dell'animale rispetto ai topi non ammalati (Figura 14B).

Figura 14

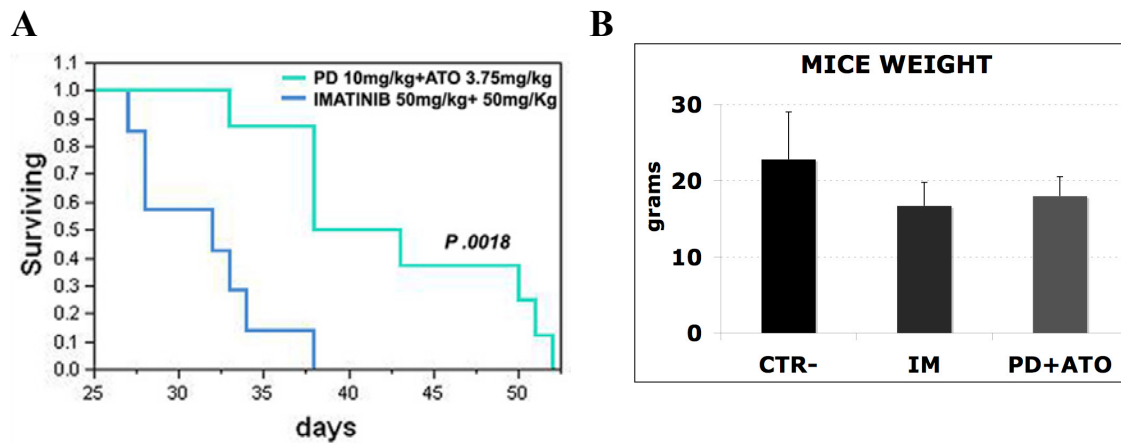


Figura 14. Il trattamento combinato PD+ATO aumenta la sopravvivenza dei topi leucemici Bcr-Abl+ Imatinib-resistenti. (A) In figura è riportata la curva di sopravvivenza calcolata col metodo di Kaplan-Meier valutata dal primo giorno di trattamento farmacologico con PD+ATO o Imatinib fino alla morte o al sacrificio degli animali sofferenti utilizzando il software statistico JMP ($P = .0018$, comparazione con test log-rank). **(B)** L'istogramma rappresenta il peso medio in grammi \pm SD degli animali sacrificati a fine il trattamento (21 giorni) con PD+ATO o Imatinib. CTR- indica il gruppo di topi non leucemici, IM indica Imatinib.

5. DISCUSSIONE

Nonostante gli eccellenti risultati ottenuti nella terapia con Imatinib, circa il 25% di pazienti non risponde alla terapia oppure ricade in corso di trattamento farmacologico, ed è noto che uno dei principali meccanismi di resistenza all'Imatinib è l'insorgenza di mutazioni puntiformi del dominio chinasi del dominio chinasi dell'oncogene Bcr-Abl. Una delle mutazioni più studiate è la T315I, che determina una elevata resistenza non solo all'Imatinib, ma anche ai TKi di nuova generazione, come Dasatinib e Nilotinib. È per questo motivo che nuovi studi sono indirizzati per trovare un regime di trattamento farmacologico per i pazienti portatori della mutazione T315I, che magari colpiscano targets molecolari disregolati nella cellula leucemica diversi da Bcr-Abl. Alcuni di questi composti sono in studio, come per esempio gli inibitori delle Aurora Kinasi, che oltre ad inibire questi enzimi coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare hanno dimostrato un'attività inibitoria anche su Bcr-Abl con mutazione T315I⁴⁶⁻⁴⁹.

In questo studio abbiamo dimostrato l'efficacia del trattamento combinato con inibitori di MEK (PD) associati all'Arsenico Triossido (ATO) nelle linee cellulari di LMC Imatinib-resistenti T315I+, già precedentemente documentata in cellule di Leucemia Acuta, leucemia crinica non resistente a Imatinib e Mieloma Multiplo²⁰⁻²³. Questa combinazione PD+ATO viene proposta in questo studio come alternativa al trattamento delle LMC Imatinib-resistenti che presentano la mutazione di Bcr-Abl-p210^{T315I}.

Dallo studio molecolare delle linee cellulari che esprimono Bcr-Abl wild-type (Ba/F3p210^{WT}) e con la mutazione T315I (Ba/F3p210^{T315I}) abbiamo osservato che il trattamento combinato PD+ATO modula negativamente l'attività chinasi di Bcr-Abl, indipendentemente dalla presenza della mutazione T315I.

Inoltre abbiamo osservato che il trattamento PD+ATO coinvolge le isoforme della proteina p73: TAp73, proapoptotica e Δ Np73, antiapoptotica. Dallo studio di queste proteine abbiamo osservato in entrambe le linee cellulari Ba/F3p210^{T315I} e Ba/F3p210^{WT}, un forte sbilanciamento del rapporto tra TAp73 e Δ Np73 indotto dal trattamento combinato a favore dell'isoforma proapoptotica TAp73. Molto interessante, il trattamento PD+ATO agisce dunque sull'alterazione dell'equilibrio TAp73/ Δ Np73 indipendentemente dalla presenza della mutazione T315I.

Un altro aspetto importante che abbiamo osservato è che l'Imatinib da una parte diminuisce la ratio $TAp73/\Delta Np73$ up-regolando la $\Delta Np73$ nelle $Ba/F3p210^{T315I}$, mentre dall'altra down-regolando la $\Delta Np73$, aumenta la ratio $TAp73/\Delta Np73$ nelle $p210^{WT}$. Questo dato potrebbe suggerire che uno dei motivi per i quali le cellule $p210^{T315I}$ sono resistenti all'Imatinib può essere legato all'up-regolazione della $\Delta Np73$, che è un dominante negativo, e dunque alla diminuzione della ratio $TAp73/\Delta Np73$. Nonostante la resistenza mediata dalla mutazione T315I sembra coinvolgere la $\Delta Np73$, la combinazione PD+ATO spegne comunque uno dei meccanismi di resistenza all'Imatinib, "by-passando" uno dei segnali indotti dall'Imatinib mediati da Bcr-Abl.

Un altro aspetto interessante che abbiamo osservato è la forte up-regolazione nelle $Ba/F3p210^{T315I}$ indotta dal trattamento PD+ATO della proteina proapoptotica p53AIP1, target sia di p53 che di p73. Questo dato pone in primo piano il ruolo della p73. Infatti, in uno studio Wendel et al⁵⁰ è stato osservato che la linea $Ba/F3p210^{T315I}$ ha una bassa espressione basale di p53 e che, a differenza della sensibile $Ba/F3p210^{WT}$, la p53 non si accumula in seguito a trattamento con l'Imatinib. Partendo dal presupposto che le cellule $Ba/F3p210^{T315I}$ hanno una basale attivazione di MEK/ERK e dunque una maggior inibizione della pathway di p53 nonostante abbia fenotipo wild type, abbiamo focalizzato lo studio molecolare e funzionale sulla p73, che infatti ha mostrato un ruolo biologico fondamentale nell'attivazione dell'apoptosi indotta dal trattamento PD+ATO. Ciononostante sarebbe interessante valutare gli effetti che questa combinazione produce sui livelli di p53 anche in relazione al fatto che p53 è controllata non solo dalla $\Delta Np73$ ma anche da importanti chinasi come MEK/ERK⁵¹ e PI3K/Akt⁵⁰ fortemente correlata tra di loro ed entrambe vie regolate da Bcr-Abl⁷. Dato che esistono delle cross-interazioni tra le pathway di ERK ed Akt, non è escluso che l'inibizione di MEK possa favorire un'attivazione di Akt e dunque contrastare un accumulo di p53, dando un ruolo biologico preminente alla p73.

Il nostro studio ha infine confermato l'efficacia della combinazione PD+ATO in un modello leucemico murino T315I+. Il trattamento farmacologico è infatti risultato efficace nel rallentare significativamente la progressione della leucemia, ed inoltre era ben tollerato in vivo, confermando che questa combinazione potrebbe essere una valida alternativa di trattamento per pazienti resistenti all'Imatinib T315I+.

Nonostante l'interesse sia quello di trovare un trattamento farmacologico efficace per le cellule iper-resistenti all'Imatinib, un altro aspetto importante da non sottovalutare è che il trattamento PD+ATO è risultato efficace anche per le cellule Bcr-Abl+ Imatinib-

sensibili. Infatti è noto che in pazienti responsivi, la terapia con Imatinib non può essere interrotta definitivamente per evitare il rischio di ricadute, in parte dovuto al fatto che le cellule staminali leucemiche, progenitori pluripotenti, sono cellule quiescenti⁵² resistenti ai TKIs⁵³ e ad altri stimoli apoptotici⁵⁴.

Inoltre è stato dimostrato che l'ATO è in grado riattivare il ciclo cellulare delle cellule staminali leucemiche quiescenti⁵⁵; proprio in questo contesto, un possibile pretrattamento dei pazienti con l'ATO può essere in grado di aumentare la suscettibilità di queste cellule all'azione del trattamento combinato PD+ATO.

Dato l'ampio spettro d'azione dell'associazione PD+ATO osservato in diversi tipi di tumori ematologici²⁰⁻²³ e dato che è stato dimostrato che ha moderati effetti inibitori sull'emopoiesi normale²³, questi nuovi dati ampliano le prospettive di utilizzo di questa combinazione anche in situazioni di forte resistenza come quella all'Imatinib.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian H. Chronic myelogenous leukemia: a review. *Am J Med.* 1996; 100: 555-570.
2. Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer.* 2003; 98: 437-457.
3. Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000; 96: 3343-3356.
4. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood.* 1996; 88: 2375-2384.
5. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science.* 1990; 247: 824-830.
6. Nimmanapalli R, Balla K. Novel targeted therapies for Bcr-Abl positive acute leukemias: beyond STI571. *Oncogene.* 2002; 21: 8584-8590.
7. Ahmed W, Van Etten RA. Signal Transduction in the Chronic Leukemias: Implications for Targeted Therapies. *Curr Hematol Malig Rep.* 2013; 8: 71-80.
8. Frankfurt O, Licht JD. Ponatinib--A Step Forward in Overcoming Resistance in Chronic Myeloid Leucemia. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 5828-5834.
9. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1038-1042.
10. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1031-1037.
11. Ernst T, La Rosee P, Muller MC, Hochhaus A. BCR-ABL mutations in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25: 997-1008.
12. Hochhaus A, La Rosee P, Muller MC, Ernst T, Cross NC. Impact of BCR-ABL mutations on patients with chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle.* 2011; 10: 250-260.
13. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-80.
14. Shah NP, Kim DW, Kantarjian H, Rousselot P, Llacer PE, Enrico A, Vela-Ojeda J,

Silver RT, Khoury HJ, Müller MC, Lambert A, Matloub Y, Hochhaus A. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica*. 2010; 95: 232-240.

15. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N, Ottmann OG, Hochhaus A, Radich JP, Saglio G, Hughes TP, Martinelli G, Kim DW, Shou Y, Gallagher NJ, Blakesley R, Baccarani M, Cortes J, le Coutre PD. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood*. 2011; 117: 1141-1145.

16. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Ellis Wong EWT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1773: 1263-1284.

17. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med*. 1999; 5: 810-816.

18. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000; 351: 95-105.

19. Lunghi P, Tabilio A, Dall'Aglio PP, Ridolo E, Carlo-Stella C, Pelicci PG, Bonati A. Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia*. 2003; 17: 1783-1793.

20. Lunghi P, Costanzo A, Levrero M, Bonati A. Treatment with arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibitor activates the p73-p53AIP1 apoptotic pathway in leukemia cells. *Blood*. 2004; 104: 519-525.

21. Lunghi P, Tabilio A, Lo-Coco F, Pelicci PG, Bonati A. Arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibition synergize to induce apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2005; 19: 234-244.

22. Lunghi P, Costanzo A, Salvatore L, Noguera N, Mazzera L, Tabilio A, Lo-Coco F, Levrero M, Bonati A. MEK1 inhibition sensitizes primary acute myelogenous leukemia to arsenic trioxide-induced apoptosis. *Blood*. 2006; 107: 4549-4553.

23. Lunghi P, Giuliani N, Mazzera L, Lombardi G, Ricca M, Corradi A, Cantoni AM, Salvatore L, Riccioni R, Costanzo A, Testa U, Levrero M, Rizzoli V, Bonati A. Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood*. 2008; 112: 2450-2462.

24. Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, Andreeff M. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2001; 108: 851-859.

25. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Rev Cancer* 2004; 4: 937-947.
26. Yu C, Krystal G, Varticovski L, McKinstry R, Rahmani M, Dent P, Grant S. Pharmacologic Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase Inhibitors Interact Synergistically with STI571 to Induce Apoptosis in Bcr/Abl-expressing Human Leukemia Cells. *Cancer Res* 2002; 62: 188-199.
27. Mohamad A, Hussein MD. Trials of Arsenic Trioxide in Multiple Myeloma. *Cancer Control*. 2003; 10: 370-374.
28. Gazitt Y, Akay C. Arsenic trioxide: An anti cancer missile with multiple warheads. *Hematology*. 2005; 10: 205-213.
29. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell RP Jr. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1341-1348.
30. Shao W, Fanelli M, Ferrara FF, Riccioni R, Rosenauer A, Davison K, Lamph WW, Waxman S, Pelicci PG, Lo Coco F, Avvisati G, Testa U, Peschle C, Gambacorti-Passerini C, Nervi C, Miller WH Jr. Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR α protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 124-133.
31. La Rosée P, Johnson K, Corbin AS, Stoffregen EP, Moseson EM, Willis S, Mauro MM, Melo JV, Deininger MW, Druker BJ. In vitro efficacy of combined treatment depends on the underlying mechanism of resistance in imatinib-resistant Bcr-Abl-positive cell lines. *Blood*. 2004; 103: 208-215.
32. Packer LM, Rana S, Hayward R, O'Hare T, Eide CA, Rebocho A, Heidorn S, Zabriskie MS, Niculescu-Duvaz I, Druker BJ, Springer C, Marais R. Nilotinib and MEK inhibitors induce synthetic lethality through paradoxical activation of RAF in drug-resistant chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011; 20: 715-727.
33. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), II: clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*. 1997; 89: 3354-3360.
34. La Rosée P, Corbin AS, Stoffregen EP, Deininger MW, Druker BJ. Activity of the Bcr-Abl Kinase Inhibitor PD180970 against Clinically Relevant Bcr-Abl Isoforms That Cause Resistance to Imatinib Mesylate (Gleevec, STI571). *Cancer Res*. 2002; 62: 7149-7153.
35. Mahon FX, Deininger MWN, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of

resistance. *Blood*. 2000; 96: 1070-1079.

36. Le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*. 2000; 95: 1758-1766.

37. Van Etten RA. Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leukemia Research*. 2004; 28S1: S21-S28.

38. Klawitter J, Kominsky DJ, Brown JL, Klawitter J, Christians U, Leibfritz D, Melo JV, Eckhardt SG, Natalie J, Serkova NJ. Metabolic characteristics of imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia cells. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 158: 588-600.

39. Pocaly M, Valérie Lagarde V, Etienne G, Dupouy M, Lapaillerie D, Claverol S, Vilain S, Bonneau M, Turcq B, Mahon FX, Pasquet JM. Proteomic analysis of an imatinib-resistant K562 cell line highlights opposing roles of heat shock cognate 70 and heat shock 70 proteins in resistance. *Proteomics*. 2008; 8: 2394-2406.

40. Grob TJ, Novak U, Maise C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, Hügli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G, Tobler A. Human Δ Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*. 2001; 8: 1213-1223.

41. Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E, Moll UM. Δ Np73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*. 2002; 196: 765-780.

42. Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, et al. DNA damage damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*. 2002; 9: 175-186.

43. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*. 2000; 102: 849-862.

44. Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, Nakamura K, Nakamura Y, Arakawa H. p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res*. 2002; 62: 2883-2889.

45. Bartholomeusz GA, Talpaz M, Kapuria V, Kong LY, Wang S, Estrov Z, Priebe W, Wu J, Donato NJ. Activation of a novel Bcr/Abl destruction pathway by WP1130 induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2007; 109: 3470-3478.

46. Young MA, Shah NP, Chao LH, Seeliger M, Milanov ZV, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ, Sawyers CL, Kuriyan J. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer Res*. 2006; 66: 1007-1014.

47. Giles FJ, Cortes J, Jones D, Bergstrom D, Kantarjian H, Freedman SJ. MK-0457, a

novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood*. 2007; 109: 500-502.

48. Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, Benten D, Bokemeyer C, Fiedler W, Moll J, Brummendorf TH. Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood*. 2008; 111: 4355-4364.

49. Modugno M, Casale E, Soncini C, Rosettani P, Colombo R, Lupi R, Rusconi L, Fancelli D, Carpinelli P, Cameron AD, Isacchi A, Moll J. Crystal Structure of the T315I Abl Mutant in Complex with the Aurora Kinases Inhibitor PHA-739358. *Cancer Res*. 2007; 67: 7987-1990.

50. Wendel HG, de Stanchina E, Cepero E, Ray S, Emig M, Fridman JS, Veach DR, Bornmann WG, Clarkson B, McCombie WR, Kogan SC, Hochhaus A, Lowes SW. Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103: 7444-7449.

51. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Ruvolo V, Andreeff M. Mitogen-activated protein kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 3210-3219.

52. Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002; 99: 319-325.

53. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*. 2011; 121: 396-409.

54. Holtz MS, Forman SJ, Bhatia R. Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia*. 2005; 19, 1034-1041.

55. Ito K, Bernardi R, Morotti A, Matsuoka S, Saglio G, Ikeda Y, Rosenblatt J, Avigan DE, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2008; 453: 1072-1078.

RINGRAZIAMENTI

Un vivo ringraziamento alle persone che hanno reso possibile questo lavoro, a Paolo Lunghi per i suoi preziosi insegnamenti, a Manuela Abeltino per il suo supporto, e al Prof. Antonio Bonati, tutor del mio dottorato.

Ringrazio inoltre il Dott. Guerino Lombardi e Micaela Ricca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini" di Brescia; il Prof. Attilio Corradi, la Prof.ssa Anna Maria Cantoni e il Dr. Stefano Jottini del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università di Parma che hanno collaborato in questo studio.

Un ringraziamento anche alla mia famiglia che mi ha supportato in tutti questi anni.