

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

VALIDAZIONE DI UN'ANALISI DI *MEMBRANE-BASED ARRAY* PER L'INDIVIDUAZIONE DI *MARKER* DI RESISTENZA AD IBRUTINIB NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

Relatore: **Prof.ssa Monica FACCO**
Dipartimento di Medicina - DIMED

Correlatore: **Dott.ssa Federica FREZZATO**
Dipartimento di Medicina - DIMED

Laureando: Riccardo GALIAZZO
Matricola: 1226812

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABBREVIAZIONI	1
RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 La leucemia linfatica cronica	5
1.1.1 <i>Presentazione clinica</i>	5
1.1.2 <i>Diagnosi</i>	5
1.1.3 <i>Prognosi</i>	7
1.1.4 <i>Epidemiologia ed eziologia</i>	9
1.1.5 <i>Patogenesi</i>	9
1.2 Trasduzione del segnale mediata dal recettore per l'antigene delle cellule B	10
1.3 Ibrutinib e meccanismi di resistenza	12
2. SCOPO DELLA TESI	15
3. MATERIALI E METODI	17
3.1 Sviluppo di una linea cellulare Ibrutinib-resistente.....	17
3.1.2 <i>Subclonaggio delle cellule di linea MEC-1#Ibr</i>	20
3.2 Analisi proteica multi-pathway	21
3.3 Valutazione dell'espressione proteica mediante <i>western blotting</i>	23
3.3.1 <i>Preparazione dei lisati cellulari</i>	24
3.3.2 <i>Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS</i>	24
3.3.3 <i>Western blotting</i>	25
3.3.4 <i>L'analisi della proteina PARP per la valutazione dell'apoptosi</i>	27
4. RISULTATI	29
4.1 Valutazione della resistenza raggiunta dalle cellule MEC-1 durante il trattamento con Ibrutinib	29
4.2 Valutazione di MDR-1 nelle cellule resistenti.....	30
4.3 Risultati ottenuti mediante “ <i>membrane-based array</i> ” sulle cellule MEC-1	31
4.4 Validazione dei dati ottenuti dal “ <i>membrane-based array</i> ” mediante <i>western blotting</i> : analisi preliminari di alcune molecole	31
4.4.1 <i>Via del segnale di MAPK</i>	31
4.4.2 <i>Src (Lyn)</i>	33
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	39
6. BIBLIOGRAFIA	43

ABBREVIAZIONI

ACT	Actina
Ac	Anticorpo
Ag	Antigene
AKT	Proteina chinasi B
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BCR	B Cell Receptor
BSA	Bovin Serum Albumin
Btk	Bruton's tyrosine kinase
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T cell therapies
CD	Cluster of Differentiation
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EBV	Epstein Barr Virus
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	Acido Etilendiaminotetracetico
Erk	Extracellular regulated kinases
FBS	Fetal Bovin Serum
FR	Fold Resistance
Hb	Emoglobina
HSCT	Haematopoietic stem cell transpalntation
Ibr	Ibrutinib
IC50	Concentrazione inibente il 50% della vitalità cellulare
Ig	Immunoglobulina
IGHV	Immunoglobulin Variable Heavy chain region
iwCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK	Janus kinase
LLC	Leucemia Linfatica Cronica
Lyn	Lck/Yes-related novel protein Tyrosine kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MDR-1	Multidrug resistance 1
MKK3	MAPK Kinase 3
MKK6	MAPK Kinase 6
MSK2	Mitogen and Stress activated protein Kinase 2
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
OS	Overall Survival
PARP	Poli-ADP-Ribosio Polimerasi
PBMC	Cellule mononucleate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Plts	Piastrine

PI3K	Phosphatidylinositol 3 - Kinase
PLC-γ2	Phospholipase C γ 2
PKC	Protein kinase C
SDS	Sodio Dodecil Solfato
SHM	Somatic Hypermutation
SHP-1	Short Heterodimer Partner-1
SMAD1	Small Mothers Against Drosophila 1
Src	Sarcoma-family kinases
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TBS 20X	Tris Buffered Saline 20X
TCR	T Cell Receptor
TFS	Treatment free survival
TGF-β	Trasforming Growth Factor beta
Tris-HCl	Tris idrossimetil amminometano cloridrato
TWEEN	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
WB	western blotting
WT	wild type
ZAP-70	Zeta-Associated Protein of 70kDa

RIASSUNTO

Introduzione

La leucemia linfatica cronica (LLC) è la forma più comune di leucemia dell'adulto ed è caratterizzata dall'accumulo clonale di piccoli linfociti B CD19+/CD5+/CD23+ dovuto sia ad una crescita incontrollata che a resistenza all'apoptosi. Tra le terapie attualmente disponibili per la LLC, Ibrutinib, inibitore di Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), ha migliorato in modo significativo la gestione della patologia, dimostrando un'elevata efficacia anche nei pazienti ad alto rischio e chemio-refrattari. Tuttavia, lo sviluppo di resistenza a questo farmaco spesso determina un esito clinico sfavorevole. Nella maggior parte dei casi (80-85%), la resistenza ad Ibrutinib è dovuta a mutazioni di Btk e/o di PLC γ . Rimane una percentuale non trascurabile (15-20%) di pazienti in cui il meccanismo di resistenza non è stato ancora individuato.

Scopo dello studio

In questa tesi ci siamo proposti di caratterizzare le molecole e i *pathway* responsabili dello sviluppo di resistenza ad Ibrutinib, evidenziati mediante l'utilizzo di un *array* proteico.

Materiali e metodi

Abbiamo utilizzato linee cellulari sensibili (MEC-1#WT) o resistenti (MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10) ad Ibrutinib sviluppate nel nostro laboratorio. Le cellule sono state mantenute in terreno IMDM, addizionato di antibiotici e 10% FBS, ad una concentrazione di 1×10^6 /mL e incubate in un termostato a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5%. In queste cellule, l'acquisizione della resistenza è stata verificata valutando la presenza della proteina PARP clivata dopo coltura con Ibrutinib 5 μ M per 72 ore ed analizzando l'espressione del fattore MDR-1 in *western blotting*. Il profilo proteico delle cellule sensibili e resistenti ad Ibrutinib è stato analizzato usando il kit RayBio® *Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55* che permette il rilevamento simultaneo dei livelli di fosforilazione di 55 proteine. In particolare, abbiamo indagato l'espressione delle molecole coinvolte nei seguenti *pathway*: MAPK, AKT/PI3K/mTOR, JAK/STAT, NF- κ B e TGF- β . La validazione di alcuni *target* emersi dall'analisi proteica è stata eseguita tramite *western blotting* con l'utilizzo dei seguenti anticorpi: anti-MEK1/2, anti-MEK1/2-S217/221, anti-p38, anti-p38-T180/Y182, anti-ERK, anti-ERK-Thr202/Tyr204, anti-Src, anti-Src-Tyr396, anti-MKK3/6 S189/S207, anti-MKK3, anti-MKK6, anti- β -actina, anti-GAPDH, e anti-tubulina.

Risultati

Abbiamo verificato che soltanto le cellule MEC-1#WT andavamo incontro ad apoptosi quando trattate con Ibrutinib per 72 ore, attraverso la presenza della proteina PARP clivata, assente nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10). In queste ultime abbiamo dimostrato anche un'*over*-espressione di MDR-1. Dall'analisi del profilo proteico è emerso che, nelle linee resistenti rispetto alla linea MEC-1#WT, vi è una de-regolazione di numerose proteine coinvolte nei *pathway* analizzati. In particolare, abbiamo evidenziato un'*over*-espressione di molecole relative al *pathway* delle MAPK (MSK2-S360, MKK6-S207, MKK3-S189, MEK1/2-S217/221), e di Src-Y419/Lyn-Y397 e una *down*-regolazione di SHP-1-S591. Questi risultati sono stati validati tramite analisi in *western blotting*, confermando i dati ottenuti con l'*array* proteico.

Conclusioni

In questo studio abbiamo utilizzato delle linee cellulari di LLC resistenti ad Ibrutinib, precedentemente sviluppate nel nostro laboratorio mediante la somministrazione di dosi crescenti e progressive del farmaco, con lo scopo di identificare possibili alterazioni nelle vie del segnale, che sono causa della resistenza a questo trattamento. In particolare, abbiamo osservato che il *pathway* delle MAPK è iper-attivato e potrebbe rappresentare un *target* terapeutico alternativo per quei pazienti resistenti al trattamento con Ibrutinib. Lo sviluppo di questo modello cellulare può diventare un utile strumento per studiare i meccanismi molecolari che determinano lo sviluppo della resistenza ad Ibrutinib e potrà dare indicazioni sul trattamento da somministrare ai pazienti resistenti alla terapia.

1 INTRODUZIONE

1.1 La leucemia linfatica cronica

La leucemia linfatica cronica (LLC) è un disordine linfoproliferativo cronico acquisito, caratterizzato dalla proliferazione clonale di piccoli linfociti B maturi, bloccati in fase G0/G1 del ciclo cellulare che coesprimono gli antigeni di superficie CD5 e CD23, e da una conta linfocitaria di cellule patologiche maggiore o uguale a 5×10^3 cellule/ μ L nel sangue periferico. Le cellule leucemiche presentano piccole dimensioni, scarso citoplasma, un nucleo sprovvisto di nucleoli distinguibili ed una cromatina parzialmente aggregata¹.

1.1.1 Presentazione clinica

Il decorso clinico e la sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC sono piuttosto variabili: alcuni soggetti rimangono asintomatici e non richiedono alcun trattamento per diversi anni, mentre altri presentano un andamento aggressivo e difficilmente controllabile con la terapia. Circa il 70% dei pazienti risultano asintomatici alla diagnosi, che viene posta dopo approfondimenti seguiti al riscontro di una linfocitosi all'esame emocromocitometrico. Possono essere presenti adenopatie non dolenti associate o meno a spleno/epatomegalia. I sintomi, poco frequenti alla diagnosi ma più frequenti nelle fasi avanzate di malattia, possono essere riferiti alla presenza di adenopatie massive, importante spleno/epatomegalia, aumento del volume dei linfonodi, astenia, perdita di peso, malessere, febbre, anemia (emoglobina, Hb $<1\text{g/dL}$) e/o trombocitopenia (conta piastrinica, Plts $<100 \times 10^9/\text{L}$) conseguenti all'infiltrazione midollare. Alcuni pazienti possono manifestare fenomeni autoimmuni, fra i quali il più frequente è l'anemia emolitica autoimmune (manifestata dall'11% dei pazienti). I pazienti possono inoltre presentare ipogammaglobulinemia che può determinare un quadro di immunodeficienza ad elevato rischio di mortalità per infezioni¹⁻³. In alcuni casi possono svilupparsi sindromi evolutive che determinano un netto peggioramento della prognosi. La sindrome di Richter, che interessa il 5-10% dei pazienti, rappresenta la trasformazione in linfoma aggressivo, quale il linfoma diffuso a grandi cellule B.

1.1.2 Diagnosi

La diagnosi di LLC deriva dall'integrazione delle informazioni cliniche ottenute dall'anamnesi, dall'esame obiettivo e dai risultati degli esami laboratoristici rappresentati dall'esame emocromocitometrico, da quello morfologico e dall'analisi immunofenotipica su sangue periferico e midollo.

I criteri diagnostici dell'“*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*” (iwCLL)¹ prevedono :

1. Una linfocitosi B assoluta $>5 \times 10^3$ cellule/ μL nel sangue periferico. Morfologicamente, i linfociti leucemici appaiono di piccole dimensioni, simili ai linfociti maturi (diametro 7-10 μm), con scarso citoplasma basofilo e privi di granuli azzurrofilii; il nucleo è sprovvisto di nucleolo e la cromatina è addensata in zolle. Nello striscio di sangue periferico sono presenti le “ombre di Gumprecht”, ossia cellule degenerate che vengono rotte nell'allestimento del preparato (figura 1).

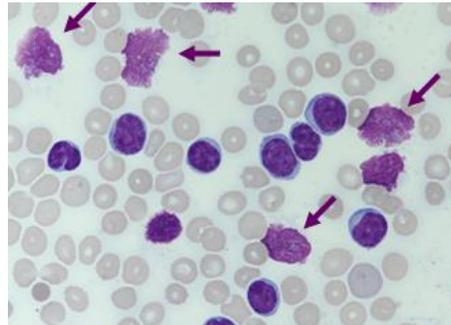


Figura 1. Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da LLC. Le frecce indicano le ombre di Gumprecht, patognomiche della LLC.

2. Un'infiltrazione linfocitaria a livello midollare superiore al 30% delle cellule nucleate. Questo criterio non è essenziale per la diagnosi, a parte i rari casi di forme di LLC midollari pure, in cui la conta dei linfociti B patologici nel sangue periferico risulti $<5.000/\mu\text{L}$. Tuttavia, lo studio del midollo osseo, sia attraverso l'analisi morfologica dell'aspirato che mediante i reperti dell'osteobiopsia, fornisce preziose informazioni per la definizione della prognosi e dello stadio, oltre a permettere un'accurata diagnosi differenziale dell'eventuale citopenia.

3. L'analisi dell'immunofenotipo è indispensabile per differenziare la LLC da altre condizioni linfoproliferative quali la leucemia prolinfocitica, la leucemia a cellule capellute, il linfoma mantellare e altre forme di linfomi. Gli elementi caratterizzanti il fenotipo di membrana delle cellule della LLC sono (figura 2):

- l'espressione dei marcatori delle cellule B (CD19, CD20, CD23) assieme al marcatore CD5 (figura 2A e 2C);

- l'espressione di un unico tipo di catena leggera delle immunoglobuline (κ o λ) (figura 2B);

- la bassa espressione di CD79b e delle immunoglobuline di superficie (sIg); nella LLC esse risultano prevalentemente IgM (figura 2D), seguite da IgD, IgG e IgA, non è rara la coespressione di IgM e IgD;

- l'espressione dell'antigene CD200 che viene utilizzata per l'analisi differenziale con il linfoma mantellare.

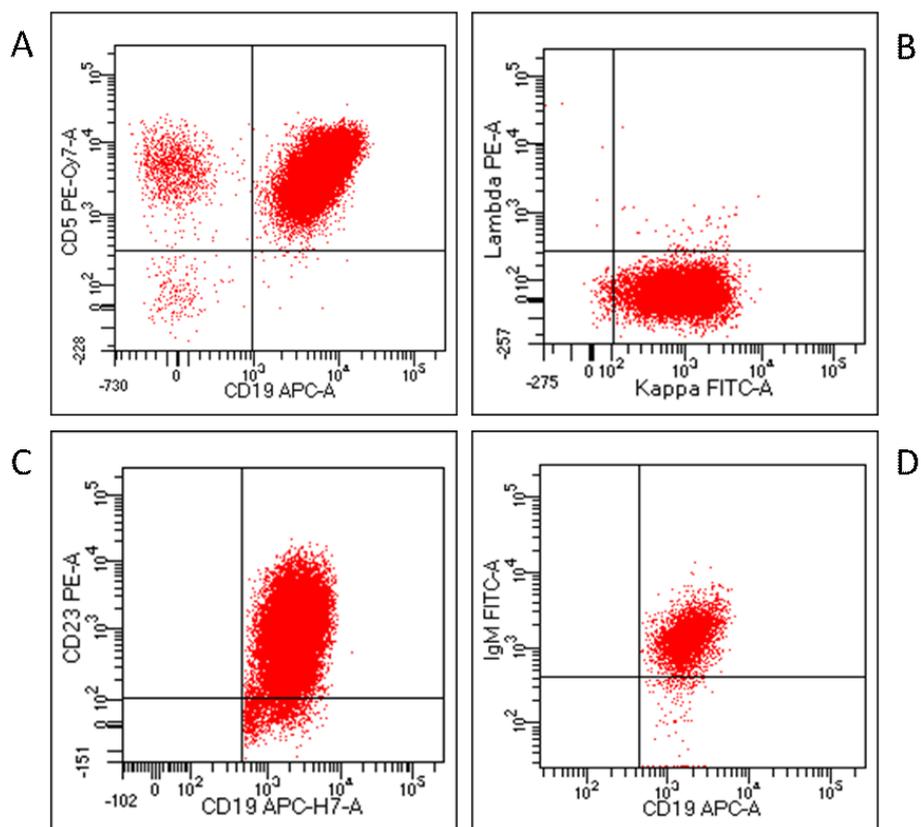


Figura 2. Citogrammi citofluorimetrici di un caso rappresentativo di LLC. La popolazione di linfociti B (CD19+) esaminata nell'esempio risulta positiva per CD5 (pannello A) e per CD23 (pannello C), esprime un unico tipo di catena leggera (k, pannello B) ed esprime IgM di superficie a bassa intensità (pannello D).

1.1.3 Prognosi

La definizione della prognosi nella gestione di un caso di LLC riveste un ruolo decisivo per la valutazione di una corretta terapia. Negli anni, sono stati proposti diversi fattori prognostici allo scopo di consentire al medico di definire il decorso clinico di ciascun paziente. Questi possono essere suddivisi in fattori prognostici tradizionali, comprendenti indici clinico-patologici e marcatori sierici, e fattori prognostici biologici¹.

I fattori prognostici tradizionali possono essere così riassunti:

- età >65 anni;
- sesso maschile;
- leucocitosi >50.000 cellule/mm³;
- tempo di raddoppiamento dei globuli bianchi <6 mesi⁴;
- prolinfociti nel sangue periferico >10%⁵;
- infiltrazione midollare di tipo diffuso;
- livelli sierici di timidina chinasi, CD23 solubile e β 2-microglobulina. Elevate concentrazioni di queste proteine rappresentano un fattore prognostico negativo;
- stadiazione clinica, che può essere condotta secondo il sistema Rai o Binet.

La stadiazione clinica secondo il sistema Rai prevede la suddivisione in cinque stadi, così definiti¹:

- **stadio 0**: linfocitosi assoluta $>15.000/\mu\text{L}$ e linfocitosi midollare $>40\%$;
- **stadio 1**: linfocitosi e linfadenomegalia;
- **stadio 2**: linfocitosi ed epato/splenomegalia, con o senza linfadenomegalia;
- **stadio 3**: linfocitosi con anemia ($\text{Hb} <11\text{g/dL}$);
- **stadio 4**: linfocitosi con piastrinopenia ($\text{Plts} <100.000/\mu\text{L}$).

Questo sistema è stato in seguito modificato, definendo lo stadio 0 come stadio a basso rischio, raggruppando gli stadi 1 e 2 nello stadio a rischio intermedio, e gli stadi 3 e 4 nello stadio ad alto rischio.

Il sistema secondo Binet si basa sul numero di aree linfatiche interessate, definite come le aree dove sono presenti linfonodi con un diametro pari o maggiore di 1cm oppure aree dove si ha organomegalia¹. Le aree considerate per la stadiazione sono: testa e collo, ascelle, inguine, milza e fegato.

Il sistema di Binet individua tre stadi:

- **Stadio A**: linfocitosi periferica e midollare con meno di tre aree linfatiche coinvolte (comprendendo sia i linfonodi che la milza e il fegato), e livelli di $\text{Hb} >10\text{g/dL}$ e di $\text{Plts} >100 \times 10^9/\text{L}$;
- **Stadio B**: linfocitosi periferica e midollare con più di tre aree linfatiche coinvolte, livelli di $\text{Hb} >10\text{g/dL}$ e di $\text{Plts} >100 \times 10^9/\text{L}$;
- **Stadio C**: anemia con $\text{Hb} <10\text{g/dl}$ e/o piastrinopenia con $\text{Plts} <100 \times 10^9/\text{L}$, indipendentemente dal numero di aree linfatiche coinvolte.

Le progressive acquisizioni in merito alla patogenesi della malattia hanno consentito di definire nuovi marcatori prognostici utilizzabili fin dal momento della diagnosi e, negli anni, di definire in modo accurato il decorso clinico della malattia. Essi descrivono alcune caratteristiche biologiche del clone leucemico cruciali nel determinare la sua capacità di proliferazione e di invasione dei tessuti. Lo studio di questi marcatori si avvale di tecniche di immunocitofluorimetria, citogenetica e biologia molecolare. I marcatori principali e maggiormente studiati sono⁶:

- 1) le ipermutazioni somatiche (SHM) dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline (IGHV). Se i geni IGHV sono mutati, ciò è indice di una prognosi migliore;
- 2) la presenza di alterazioni cromosomiche. Le più frequenti sono alcune delezioni (13q14, 11q22-23, 17p13, 6q21) e la trisomia del cromosoma 12;
- 3) l'espressione sulla membrana cellulare di CD38 e CD49d. I casi di LLC con una quota di cellule CD38 positive superiore al 20-30% presentano una prognosi negativa. CD49d è un fattore prognostico negativo e risulta essere l'unico marker individuabile tramite citofluorimetria ad avere

una rilevanza prognostica indipendente per la *treatment-free survival* (TFS - sopravvivenza in assenza di trattamento);

4) l'espressione intracitoplasmatica della protein chinasi associata alla catena ζ del TCR di 70kDa (ZAP-70) La presenza di ZAP-70 in più del 20% del clone leucemico è un fattore prognostico sfavorevole;

5) l'espressione dell'enzima telomerasi e la lunghezza dei telomeri nelle cellule leucemiche di LLC⁷.

1.1.4 Epidemiologia ed eziologia

La LLC è la forma più comune di leucemia nella popolazione adulta occidentale, con un'incidenza di 2-6 casi ogni 100.000 abitanti, mentre è rara in Giappone e nei Paesi orientali ove l'incidenza è <1 caso ogni 100.000 abitanti. In Italia si può stimare un numero medio annuo di nuovi casi di circa 1.600 fra gli uomini e 1.150 fra le donne. L'incidenza nella regione Veneto è pari a 4,8 casi ogni 100.000 abitanti adulti, con circa 179 nuovi casi all'anno. Il rischio di essere affetti da LLC cresce notevolmente con l'età: l'incidenza aumenta da 1 caso/100.000 abitanti/anno nella fascia 40-50 anni a circa 20/100.000 casi nella fascia 70-80 anni⁸. L'età media alla diagnosi è di 72 anni, con oltre il 40% dei pazienti di età superiore a 75 anni. Nonostante meno del 15% abbia un'età inferiore a 60 anni, negli ultimi anni è stato documentato un aumento dell'incidenza della malattia nella popolazione al di sotto dei 55 anni, senza che ciò modifichi il tasso di incidenza globale. Analisi epidemiologiche mostrano che tale patologia è più frequente nel sesso maschile, con un rapporto tra l'incidenza nei maschi e nelle femmine pari a 1,5-2:1. L'eziologia della LLC è sconosciuta; l'esposizione ai comuni agenti cancerogeni non sembra associarsi allo sviluppo della malattia.

1.1.5 Patogenesi

Lo studio dei processi mediante i quali avvengono le alterazioni dello stato fisiologico che portano allo sviluppo della LLC ha permesso di individuare l'origine del clone leucemico nella cellula staminale emopoietica, che ha subito modificazioni genetiche ed epigenetiche⁹.

I linfociti B di LLC, oltre ad esprimere la molecola CD19, sono tipicamente caratterizzati dalla presenza della glicoproteina trans-membrana CD5¹⁰. Lo studio dei meccanismi patogenetici è stato rivoluzionato con la scoperta di due sottogruppi di cloni maligni distinti in base alla presenza (SHM+) o assenza (SHM-) di ipermutazioni somatiche nella sequenza di geni che codificano per la regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline di superficie: sembra infatti che la popolazione SHM+ derivi da una cellula B che ha incontrato l'antigene all'interno del centro germinativo. Dal punto di vista del profilo genico, la cellula B di LLC è simile alla cellula B della memoria che esprime la proteina recettoriale CD27. Si ritiene che, nel caso del sottogruppo SHM+, la cellula d'origine

derivati da un linfocita B della memoria CD27⁺ che abbia incontrato l'antigene in una reazione T-dipendente all'interno del centro germinale, mentre nel caso del sottogruppo SHM⁻ si ritiene che lo stimolo sia avvenuto al di fuori del centro germinativo e sia stato incapace di attivare il processo delle ipermutazioni somatiche⁹. Queste teorie rendono conto dell'origine delle cellule leucemiche, ma non spiegano il diverso comportamento biologico dei due sottotipi, che sta alla base del diverso comportamento clinico. Le forme di LLC mutate (SHM⁺), infatti, hanno generalmente un andamento clinico indolente e possono rimanere asintomatiche per anni; quelle non mutate (SHM⁻), invece, sono più aggressive, richiedono un intervento terapeutico precoce e possono essere causa di morte in breve tempo.

1.2 Trasduzione del segnale mediata dal recettore per l'antigene delle cellule B

I linfociti B fanno parte dell'immunità adattativa di tipo umorale e sono in grado di secernere anticorpi specifici contro determinati antigeni. Tale capacità viene acquisita dopo opportuna attivazione e stimolazione del linfocita da parte dell'antigene stesso attraverso il recettore per l'antigene delle cellule B (BCR) espresso dalla cellula immunitaria sulla propria superficie. Il BCR è un complesso transmembrana costituito da un'immunoglobulina appartenente ad una delle varie classi (M, D, G, E ed A), associata in modo non covalente all'eterodimero Ig α -Ig β (anche noto come CD79a-CD79b). Nel contesto della LLC, il meccanismo di attivazione e il *signaling* del BCR risultano essere alterati in alcune tappe fondamentali. Sono state evidenziate una ridotta espressione di CD79b da parte delle cellule leucemiche, una risposta variabile alla stimolazione antigenica e un'attivazione costitutiva della via a valle del recettore, con conseguente predominanza dei segnali di sopravvivenza e replicazione rispetto a quelli di morte cellulare programmata¹¹.

Nell'ambito della LLC, sono state riconosciute alcune anomalie in molecole importanti per la sopravvivenza, la proliferazione e l'apoptosi cellulare. Le molecole principalmente coinvolte sono:

- Lyn: gli studi effettuati su questa tirosin-chinasi hanno dimostrato come tale enzima sia costitutivamente attivato nelle cellule B leucemiche e sovraespresso rispetto ai linfociti B normali¹².

- Btk (*Bruton's tyrosine kinase*): diverse indagini riguardanti questa tirosin-chinasi hanno dimostrato, nei pazienti leucemici, un'amplificazione delle vie di segnale corrispondenti tramite i suoi effettori PI3K (*phosphoinositide 3-kinases*), PLC- γ 2 (*phosphatidylinositol-specific phospholipase C γ 2*), NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), che comporta un aumento della sopravvivenza. L'inibizione di Btk porta infatti al blocco della proliferazione, alla promozione dell'apoptosi e previene la risposta a stimoli di sopravvivenza provenienti dal microambiente¹³.

- Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*): tali molecole giocano un ruolo in questo meccanismo inibendo o promuovendo l'apoptosi.

- Erk1/Erk2 (*Extracellular regulated kinases*): tali chinasi, appartenenti alla famiglia delle MAP chinasi, sono costitutivamente fosforilate e questo determina una ridotta risposta in seguito a stimolazione del BCR¹⁴.

- ZAP70 (*Zeta-Associated Protein of 70 kDa*): questa proteina è una tirosin-chinasi associata a recettore, espressa da linfociti T e cellule NK, ma non dai linfociti B normali. Risulta espressa in circa la metà dei casi di leucemia linfatica cronica, ed è principalmente correlata ad un fenotipo aggressivo di LLC, ovvero quello associato ad uno stato non mutato dei geni IGHV¹⁵.

La via del segnale mediata dal BCR riveste un ruolo chiave nella crescita e nella sopravvivenza cellulare della LLC, oltre a rappresentare un importante bersaglio terapeutico (figura 3). Ad oggi sono stati sviluppati nuovi farmaci biologici diretti contro le proteine sopra citate. Tra gli altri, Ibrutinib, il cui utilizzo è stato approvato sia per le terapie di prima linea che per le recidive, è un farmaco a bersaglio molecolare inibitore della Btk che si è rivelato molto efficace nel trattamento dei pazienti di LLC recidivanti/refertari.

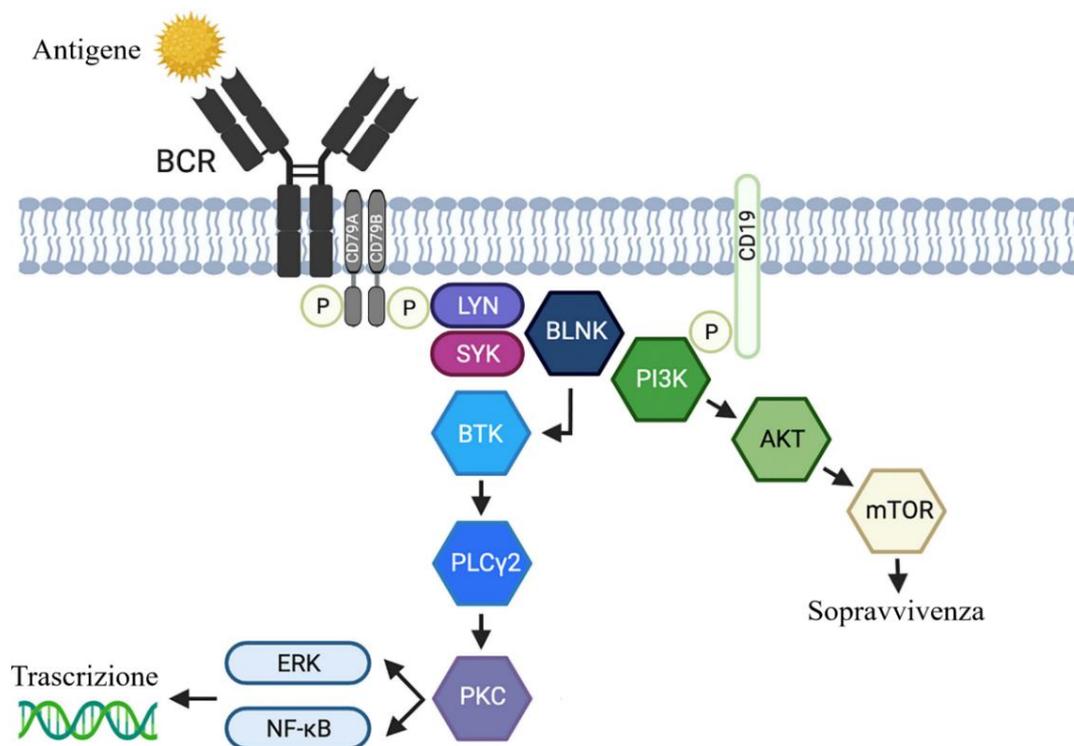


Figura 3. Via di trasduzione del segnale mediata dal BCR. Il legame con l'antigene da parte delle immunoglobuline di superficie avvia la segnalazione del BCR, con conseguente accoppiamento e autofosforilazione dell'eterodimero CD79a/CD79b da parte della Src chinasi Lyn. La fosforilazione delle sequenze ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based*) fa partire la cascata di molecole di segnalazione. Queste includono SYK, BTK, PLC-γ2 e PKC, che portano all'attivazione di NF-κB, PI3K ed ERK. Adattata da Ahn IE *et al*¹⁶.

1.3 Ibrutinib e meccanismi di resistenza

Lo scenario di trattamento della LLC si è sensibilmente modificato in seguito all'individuazione di agenti in grado di colpire la via del BCR. Un ruolo significativo è da attribuirsi ad Ibrutinib, un inibitore di Btk, attivo per via orale, che induce l'apoptosi nelle cellule di LLC. Questo farmaco si lega covalentemente a Btk, inibendo *in vivo* la via del segnale a valle del BCR causando una riduzione della proliferazione ed un aumento della morte cellulare¹⁷. Sebbene la terapia con Ibrutinib consenta un controllo duraturo e ben tollerato della LLC, si sono osservati fenomeni di resistenza sia primaria (mancanza di risposta al farmaco) che secondaria (insorta dopo un'iniziale risposta al trattamento), rispettivamente nel 13-30% e 8-13% dei casi¹⁸. I fenomeni di resistenza primari sono quelli rappresentati dai soggetti primariamente refrattari al farmaco o che sviluppano una progressione a malattia aggressiva precoce entro i 15 mesi. Essi presentano spesso una trasformazione istologica in Sindrome di Richter che non può essere attribuita a meccanismi di resistenza sviluppatasi nei confronti di Ibrutinib bensì alle caratteristiche intrinseche della patologia di base e ad alterazioni genetiche avvenute prima dell'inizio del trattamento. I pazienti con questo profilo di resistenza, soprattutto quelli con trasformazione a Sindrome di Richter, hanno un esito estremamente sfavorevole. Il secondo tipo di resistenza è quello presentato da quei pazienti che vanno in progressione più tardivamente, in genere almeno dopo due anni di terapia, proprio a causa dello sviluppo di meccanismi che consentono un'elusione molecolare all'azione di Ibrutinib. La resistenza si manifesta, in questo caso, con una progressione clinica e biochimica in corso di terapia¹⁹.

Sono stati finora individuati due principali meccanismi mutazionali che contrastano l'efficacia di Ibrutinib e che sono alla base della resistenza al farmaco: il primo comporta l'incapacità del farmaco di inibire la chinasi bersaglio, il secondo rende la via di segnale a valle costitutivamente attiva. Studi di *whole-exome sequencing* hanno messo in luce come, nell'80-85% dei casi, le principali proteine responsabili della resistenza ad Ibrutinib sono Btk (nella maggior parte dei casi la mutazione è C481S, in cui si ha una sostituzione con serina, mentre meno frequenti sono le mutazioni C481R, C481F e C481Y in cui la cisteina è sostituita rispettivamente con arginina, fenilalanina e tirosina) e PLC- γ 2 (le mutazioni principali includono R665W, S707Y e L845F, a cui sono state recentemente aggiunte P664S e la delezione di sei nucleotidi all'interno dell'esone 20)²⁰.

Tutte le mutazioni sopra evidenziate, riguardanti sia Btk che PLC- γ 2, precedono di diversi mesi (fino a 15) la progressione clinica. Si potrebbe quindi, monitorare l'andamento della malattia verificando l'insorgenza di queste alterazioni e identificare i soggetti ad alto rischio di progressione nonostante la monoterapia con Ibrutinib. Grazie a questa stratificazione del rischio si possono indirizzare questi pazienti verso terapie che usano farmaci in combinazione o proporre approcci

alternativi, come l'uso di Venetoclax (inibitore di Bcl2), di inibitori dei check-point immunitari, di cellule CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T cell therapies*), o il trapianto di midollo osseo allogenico (HSCT)¹⁹.

Tuttavia, non tutti i pazienti refrattari alla terapia con Ibrutinib presentano le mutazioni sopra riportate, quindi, è ragionevole ipotizzare che esistano altri sistemi di *escaping* che devono essere ulteriormente indagati. A questo proposito, nel nostro laboratorio abbiamo utilizzato un approccio di “*membrane-based array*” e, tramite l'utilizzo di anticorpi, abbiamo valutato l'espressione di alcuni marcatori in cellule resistenti e in cellule sensibili all'azione di questo farmaco.

2 SCOPO DELLA TESI

La LLC è caratterizzata dall'accumulo di piccoli linfociti B maturi e monoclonali resistenti all'apoptosi e soggetti all'attivazione anomala della via di trasduzione del segnale mediata dal BCR. Ibrutinib, inibitore della *Bruton's tyrosine kinase* (Btk), è un farmaco a bersaglio molecolare, introdotto nel trattamento della LLC nel 2016. Nonostante la dimostrata efficacia del farmaco, una quota sempre maggiore di pazienti manifesta resistenza al trattamento, che si sviluppa attraverso meccanismi ancora in parte sconosciuti. Laddove questi fossero individuati, potrebbero consentire lo sviluppo di strategie terapeutiche per superare la resistenza al farmaco.

L'obiettivo che questa tesi si è proposto è quello di:

- sviluppare una linea di cellule MEC-1 resistenti ad Ibrutinib, tramite esposizione progressiva a dosi crescenti del farmaco;
- individuare marcatori di resistenza ad Ibrutinib mediante un'analisi proteica di *membrane-based array*;
- ricercare possibili alterazioni nelle principali vie del segnale potenzialmente coinvolte nello sviluppo della resistenza ad Ibrutinib.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Sviluppo di una linea cellulare Ibrutinib-resistente

Per i nostri esperimenti abbiamo allestito colture di cellule MEC-1, riconosciute dalla letteratura come modello per i linfociti B neoplastici di LLC^{21,22}. Tale linea cellulare è stata sviluppata nel 1993 a partire dalle cellule del sangue periferico di un uomo di 61 anni, caucasico, affetto da leucemia linfatica cronica in trasformazione in leucemia prolinfocitica²². Le cellule MEC-1 sono tipicamente rotondeggianti con diametro di 15-20 μm , crescono in sospensione, singolarmente o in piccoli aggregati e hanno un tempo di raddoppio di circa 40 ore (Figura 4).

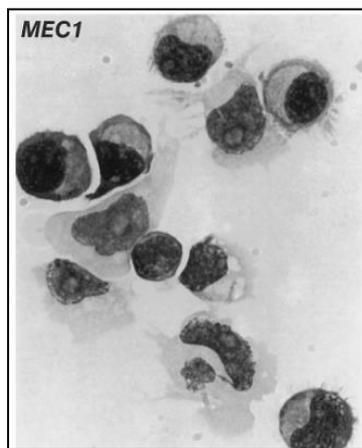


Figura 4. Citocentrifugato di cellule MEC-1²¹.

Queste cellule esprimono ad alta intensità le immunoglobuline di superficie, in particolare le stesse catene leggere (κ) e pesanti (M e D) delle cellule originali. Presentano i marcatori tipici delle cellule B mature (CD19, CD20, CD21, CD22) e hanno un'intensa espressione di membrana di CD80 e CD86, molecole co-stimolatorie assenti sulla superficie delle cellule di LLC. Il paziente, da cui è stato prelevato il campione di cellule, era EBV-sieropositivo, i suoi linfociti patologici erano EBNA (*Epstein-Barr nuclear antigen*) negativi, ma è stato verificato, tramite PCR, che le linee cellulari cresciute spontaneamente, sono positive per i geni EBNA-2, tipici del virus di Epstein-Barr (EBV).

Le cellule sono state coltivate in terreno IMDM (Life Technologies Corporation; New York, USA), addizionato di antibiotici (Penicillina/Streptomicina) al 5% e 10% FBS, alla concentrazione di $1 \times 10^6/\text{mL}$ in piastre da 6 pozzetti e incubate in un termostato a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5%.

Le cellule sono state coltivate per 18 mesi in due diverse condizioni (Figura 5A):

- *alone*: le cellule di linea MEC-1 sono state depositate in piastra alla concentrazione indicata senza l'aggiunta di farmaci o inibitori (condizione indicata con MEC-1#WT, *wild type*);

- con Ibrutinib: le cellule di linea MEC-1 sono state depositate in piastra con l'aggiunta di una data concentrazione, crescente nel tempo, di Ibrutinib (Selleck Chemicals; Houston, TX, USA) (condizione indicata con MEC-1#IBR).

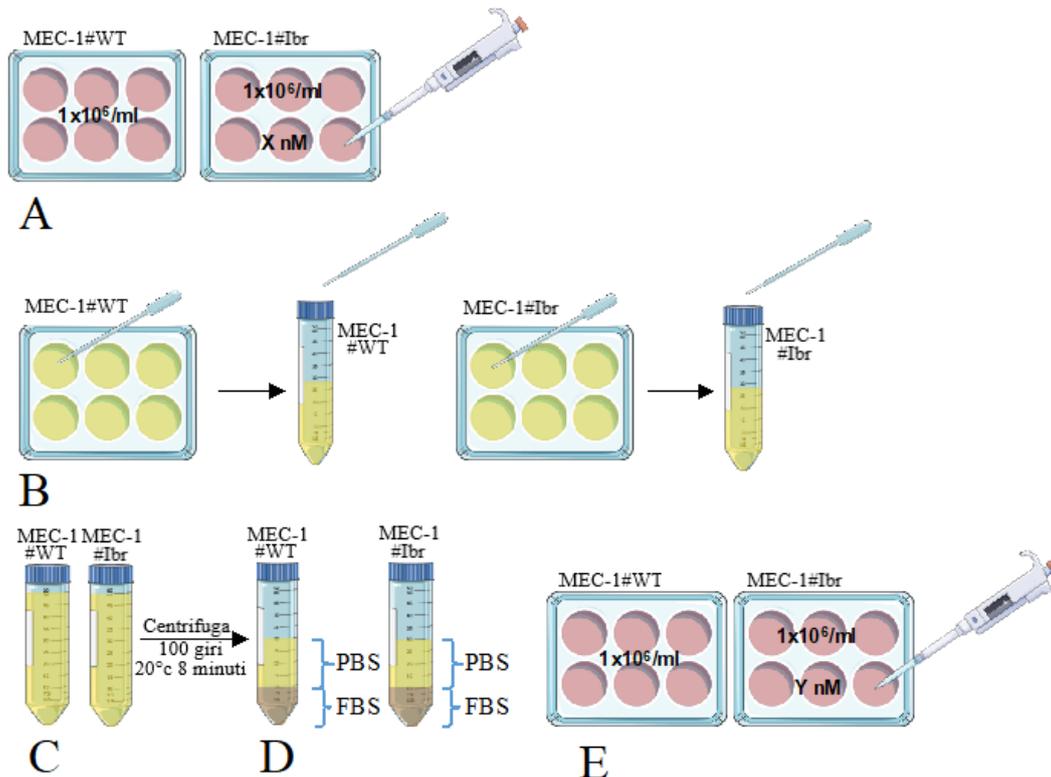


Figura 5. Induzione della farmacoresistenza nelle colture cellulari di cellule di linea MEC-1. **A.** Le cellule sono state distribuite alla concentrazione di 1x10⁶/mL, 5mL per ogni pozzetto, in modo da avere 5 milioni di cellule in ciascun pozzetto; inoltre, nei pozzetti della piastra MEC-1#IBR, è stata aggiunta una concentrazione iniziale di 5 nM di Ibrutinib. **B.** A distanza di 7 giorni si è proceduto al lavaggio delle cellule al fine di seminarle con la nuova concentrazione di Ibrutinib. **C.** Per il lavaggio, le cellule sono state portate a volume con PBS 1X sterile e si è proceduto ad una centrifugazione a 100g senza freno a 20°C per 8 minuti. **D.** Un passaggio aggiuntivo, che si può scegliere di fare nel momento in cui la quota di cellule apoptotiche e detriti risulta importante, è la stratificazione delle cellule con FBS (15mL di FBS su cui si stratificano le cellule diluite in 30mL di PBS; centrifugazione 100g senza freno a 20°C per 8 minuti). **E.** Una volta terminata la centrifugazione di cui al punto C o D si è aspirato il surnatante, si sono contate e risospese le cellule in modo tale da avere una concentrazione di 10⁶/mL e sono state distribuite nuovamente in piastra; nei pozzetti della piastra MEC-1#IBR è stata aggiunta una concentrazione di Ibrutinib maggiore dalla precedente (ad es.: X = 200nM; Y = 400nM).

L'obiettivo ricercato è stato quello di ottenere una coltura di cellule MEC-1 che fosse Ibrutinib-resistente, in modo da simulare le condizioni di resistenza al farmaco che si verificano in quei pazienti che, *in vivo*, non rispondono al trattamento. Le cellule di linea MEC-1, quindi, sono state aggiunte in piastra a concentrazioni progressivamente crescenti di Ibrutinib, così da indurre la resistenza al trattamento e, allo stesso tempo, poter analizzare progressivamente i cambiamenti di espressione sia proteica che genica.

La concentrazione di Ibrutinib con cui è iniziato il processo di induzione di farmacoresistenza è stata 5nM e tale concentrazione è stata mantenuta per due settimane. Successivamente, alle cellule è stata somministrata una concentrazione 10nM di Ibrutinib, mantenuta anch'essa per due settimane; è stato poi aggiunto Ibrutinib 50nM, 100nM, 200nM, 400nM, 1µM, 2µM, 3µM, 4µM, 5µM, 7,5µM, 8µM, 9µM, 10µM, 12,5µM, 15µM, 17,5µM, 20µM, 22,5µM, 25µM, 27,5µM e 30µM (Figura 5E). A partire dalla concentrazione di 7,5µM, le dosi di farmaco sono state incrementate ogni 4 settimane. Raggiunta la concentrazione 30µM si è sospeso l'incremento della somministrazione del farmaco perché confrontando il rapporto tra la IC50 delle cellule resistenti e quella delle cellule *wild-type* (questo valore viene chiamato *Fold Resistance* o *FR*) è stato ottenuto un valore compreso tra 2 e 5, il quale indica che la linea cellulare in analisi è diventata resistente al farmaco somministrato. È stata valutata la vitalità delle cellule mediante test citofluorimetrico con annessina e ioduro di propidio, dimostrando che esse avevano una vitalità adeguata (maggiore dell'85%), nonostante il trattamento, per poter sostenere dosi maggiori di farmaco.

Settimanalmente, le cellule dei sei pozzetti delle due condizioni sono state raccolte ciascuna in un'unica provetta da 50 mL, così da avere tutte le cellule raccolte in due provette da 50 mL: MEC-1#WT e MEC-1#IBR (Figura 5B); così riunite, le cellule sono state lavate dai detriti con utilizzo di PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*; Euroclone, Milano, Italia) mediante centrifugazione a 100g a 20°C per 8 minuti senza freno (Figura 5C). Successivamente, il surnatante è stato aspirato ed eliminato, facendo attenzione a mantenere il *pellet* sul fondo della provetta; il *pellet*, costituito dalle cellule vitali, è stato risospeso in una quantità adeguata di terreno (IMDM con 10% FBS) per avere una concentrazione 10⁶/mL di cellule, utile alla successiva deposizione in piastra.

Ogni due settimane oltre al lavaggio con PBS 1X è stata effettuata una stratificazione con FBS, che permette di rimuovere con maggiore efficienza detriti cellulari e cellule apoptotiche. A questo scopo, dopo il lavaggio in PBS 1X, le cellule sono state risospese in 30mL di PBS 1X, stratificate sopra uno strato di 15mL di FBS e centrifugate a 100g a 20°C per 8 minuti senza freno (Figura 5D). Successivamente, il surnatante, costituito da PBS 1X ed FBS, è stato aspirato ed eliminato, mentre il *pellet*, costituito dalle cellule vitali, è stato risospeso in una quantità adeguata di terreno (IMDM con 10% FBS) per avere una concentrazione 1x10⁶/mL di cellule, utile alla successiva deposizione in piastra (Figura 5E).

Prima di ogni incremento di concentrazione del farmaco sono stati raccolti i lisati proteici cellulari delle due condizioni al fine di poter valutare l'evoluzione dell'espressione proteica; oltre a ciò, sono stati raccolti anche campioni di cellule utilizzati per future analisi del DNA e sono stati effettuati congelamenti vitali in DMSO (*dimethyl sulfoxide*; Sigma-Aldrich) per ognuna delle condizioni di coltura.

Con questo metodo di progressiva esposizione delle cellule ad Ibrutinib al fine di ottenere la resistenza al farmaco, abbiamo ottenuto un modello cellulare con cui poter valutare l'evoluzione della resistenza nei pazienti ad Ibrutinib.

3.1.2 Subclonaggio delle cellule di linea MEC-1#Ibr

Considerato che, sotto la pressione farmacologica, cellule diverse della miscela di cellule MEC1#IBR potrebbero aver attivato meccanismi diversi di resistenza, abbiamo eseguito un subclonaggio delle cellule MEC1#IBR quando erano trattate con la concentrazione di Ibrutinib 8 μ M (MEC1#IBR-8 μ M). L'obiettivo è stato quello di isolare ed espandere cellule che potessero essere più resistenti ad Ibrutinib rispetto ad altre popolazioni della stessa linea cellulare e di effettuare in futuro una valutazione dell'espressione genica e proteica dei cloni più resistenti (ad es. con tecniche di *Reverse Phase Protein Array* e *Next Generation Sequencing*). Per eseguire il subclonaggio, si è utilizzato il metodo della "limited dilution", tecnica che consente di ottenere una popolazione cellulare monoclonale a partire da una massa policlonale di cellule tramite diluizioni progressive della coltura cellulare madre (in questo caso le MEC1#IBR-8 μ M). A partire da una sospensione cellulare di 1x10⁶/mL si sono eseguite delle diluizioni crescenti, da 1:10 a 1:1.000.000, in maniera tale da ottenere 10 aliquote contenenti verosimilmente una sola cellula per mL, che sono state distribuite in una piastra da 48 pozzetti, alla concentrazione di 1/mL in un terreno costituito da IMDM con antibiotici (Penicillina/Streptomicina) al 5% e 10% FBS, incubate in un termostato a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5% (Figura 6). Settimanalmente è stato cambiato il terreno, sono state contate le cellule e, una volta raggiunto un numero sufficiente (10x10⁶ cellule), sono state trasferite in fiasche da 50mL. Similmente a quanto fatto con le linee cellulari MEC-1#WT e MEC-1#Ibr, sono stati collezionati i lisati proteici cellulari di ogni clone al fine di valutare l'evoluzione dell'espressione proteica; oltre a ciò, sono stati raccolti anche campioni di cellule congelati per l'estrazione del DNA e congelamenti vitali in DMSO. Infine, con l'obiettivo di individuare i subcloni più resistenti, sono state determinate le IC50 (Concentrazione inibente la vitalità del 50%) e la FR (*fold resistance*), non mostrate in questa tesi. Per i nostri esperimenti abbiamo infine così selezionato le linee MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10 (concentrazione di farmaco pari a 30 μ M), oltre alle cellule MEC-1#WT.

Le analisi di sequenziamento per la valutazione di mutazioni su Btk e PLC γ sono state eseguite nel laboratorio del Prof. Marasca (Università di Modena e Reggio Emilia) e non hanno evidenziato alcuna mutazione dei geni Btk e PLC γ nelle quattro linee oggetto del nostro studio (MEC-1#WT, MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10).

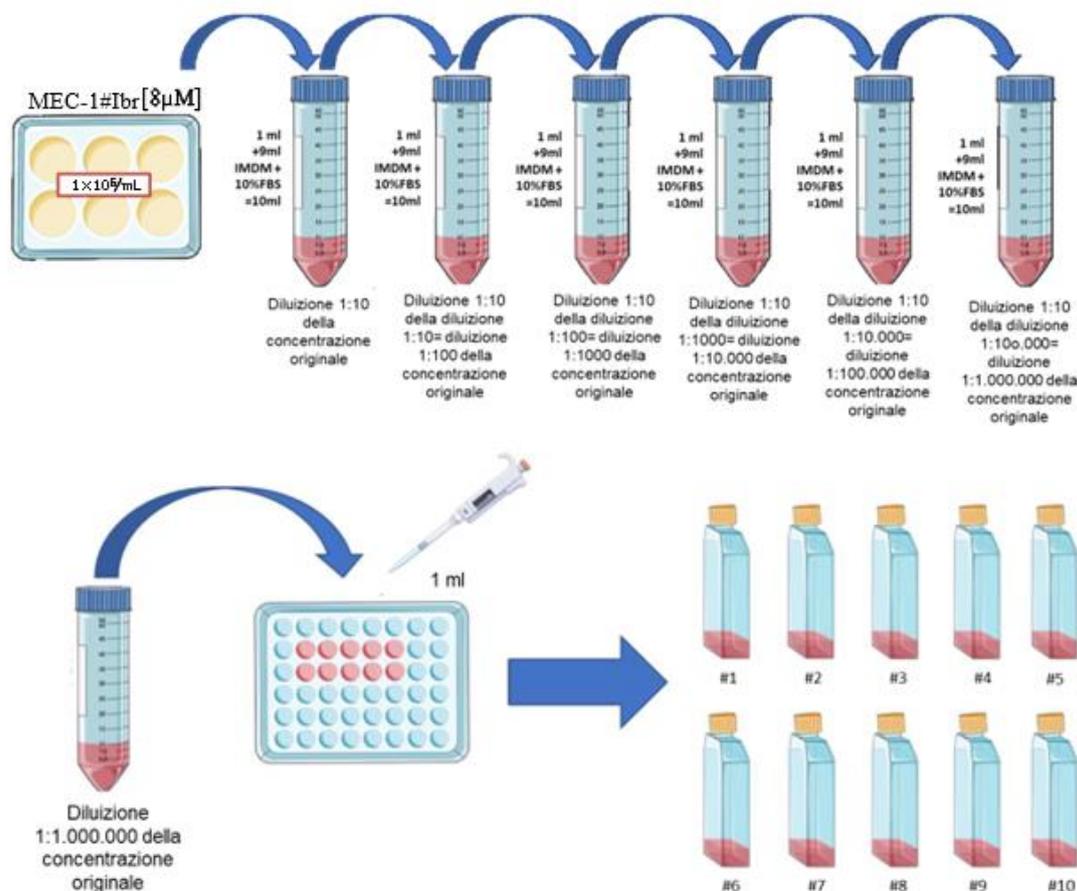


Figura 6. Subclonaggio delle cellule di linea MEC1#Ibr. A partire da una sospensione di cellule $1 \times 10^6/\text{mL}$ si sono eseguite delle diluizioni crescenti, da 1:10 a 1:1.000.000 delle cellule MEC1#Ibr- $8\mu\text{M}$. 1 mL di cellule MEC1#IBR- $8\mu\text{M}$ è stato raccolto ed è stato posto in una provetta da 50 mL; sono stati aggiunti 9 mL di IMDM + 10% FBS e si è agitato delicatamente. In seguito, è stato raccolto 1 mL da questa soluzione e lo si è posto in una provetta da 50 mL a cui sono stati aggiunti 9 mL di terreno IMDM + 10% FBS. Dopo aver agitato delicatamente, si è prelevato 1 mL da questa soluzione e lo si è versato in una nuova provetta da 50 mL. Si è proceduto in questa maniera fino ad ottenere una diluizione 1:1.000.000. Il volume totale (10 mL) è stato distribuito in una piastra da 48 pozzetti, 1 mL a pozzetto, ottenendo così 10 pozzetti contenenti ipoteticamente una sola cellula ciascuno. Le cellule sono state fatte crescere, periodicamente si è cambiato il terreno e si sono effettuati dei lavaggi in PBS + FBS. Una volta raggiunto un numero sufficiente di cellule (10×10^6 cellule), queste sono state trasferite in fiasche da 50 mL e sono state esposte a dosi crescenti di farmaco.

3.2 Analisi proteica multi-pathway

Per questa analisi è stato utilizzato il kit *RayBio® Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55* (RayBiotech Life; Norcross, USA) che rappresenta uno strumento rapido per il rilevamento simultaneo dei livelli relativi di fosforilazione di 55 proteine nel contesto di 5 vie del segnale: MAPK, AKT, JAK/STAT, NF- κB e TGF- β . Questo avviene tramite l'impiego di 5 membrane di nitrocellulosa a cui sono fissati anticorpi primari specifici in grado di legare le proteine di interesse. In seguito all'aggiunta del campione sulle membrane, le proteine bersaglio, se presenti, si legano agli anticorpi primari. Successivamente, le membrane vengono incubate con un anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi e diretto in modo specifico contro l'anticorpo primario, che ne permette la visualizzazione tramite chemiluminescenza (Figura 7).

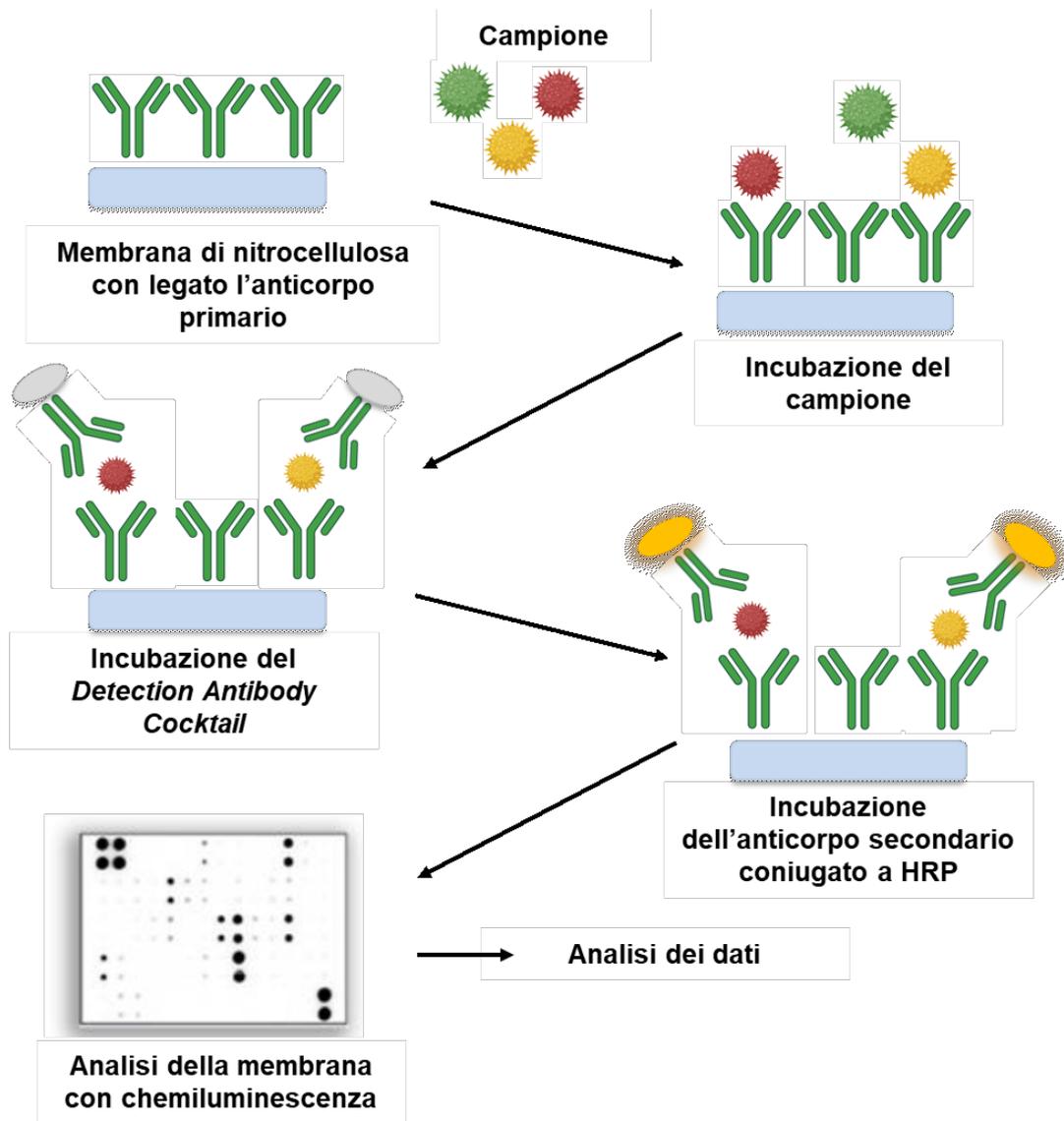


Figura 7. Rappresentazione schematica del funzionamento dell'array *RayBiotech® Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55*.

Tale saggio è stato eseguito seguendo la procedura descritta nel protocollo fornito dal produttore, di seguito brevemente illustrata. Sono stati esaminati *pellet* secchi (cellule congelate a -80°C) da 15 milioni di cellule ciascuno per le linee MEC-1#WT, MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10. A questi sono stati aggiunti $750\mu\text{L}$ di *Lysis Buffer* 1X e un *cocktail* di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (diluiti 1:100), forniti dal kit. Le proteine contenute nei lisati proteici ottenuti dai *pellet* secchi sono state quantificate mediante il saggio di Bradford, che utilizza le caratteristiche spettrali del *Coomassie Brilliant Blue* per stimare la quantità di proteine in una soluzione. Per ogni membrana sono stati usati $400\mu\text{g}$ di proteina. Le membrane sono state incubate per 30 minuti con il *Blocking Buffer* fornito dal kit. Questo poi è stato aspirato, alle membrane è stato aggiunto il campione (sotto forma di lisati proteici) e sono stati messi in incubazione *overnight* a 4°C . In seguito, dopo aver aspirato il campione, si sono eseguiti cinque lavaggi di 5 minuti ciascuno (3 con *Washing Buffer I* e 22

2 con *Washing Buffer II*, entrambi forniti dal kit), per eliminare le proteine in eccesso, non legate agli anticorpi sulle membrane. Successivamente, ad ogni membrana, è stato aggiunto 1mL di *Detection Antibody Cocktail*, fornito dal kit, per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo aver eseguito altri 5 lavaggi, come i precedenti, la membrana è stata incubata per 2 ore con un anticorpo secondario anti-IgG coniugato con l'enzima perossidasi di rafano, *HRP-Anti-Rabbit IgG*. Trascorse le 2 ore di incubazione, sono stati eseguiti altri cinque lavaggi e si è proceduto con la rivelazione anticorpale tramite i *Detection Buffer C* e *D* forniti dal kit: ogni membrana è stata incubata per 2 minuti con 250µL di ognuno dei due buffer. Questi provocano una reazione di ossidazione alla quale segue l'emissione di luce che viene rivelata dall'apposito apparecchio *ImageQuant LAS 600* (GE Healthcare; UK). L'analisi densitometrica è stata eseguita con *Image J*. In particolare, per ogni membrana è stata identificata una tempistica di esposizione che ci garantisce di ottenere un elevato rapporto tra il segnale rilevato ed il rumore di fondo. Per ogni spot è stata poi misurata la densità del segnale ed estratto un valore numerico (arbitrario) mediante analisi densitometrica con il programma *Image J*. Poiché ogni anticorpo era presente nella membrana in duplicato, per ogni *target* è stata calcolata la media e il valore ottenuto è stato poi rapportato alla media dei valori dei controlli positivi del relativo *array*. Gli istogrammi delle densitometrie sono stati ottenuti con *GraphPad Prism* (versione 9.2.0).

3.3 Valutazione dell'espressione proteica mediante *western blotting*

Il *western blotting* (WB) o *immunoblotting* è una tecnica immunochimica che consente l'identificazione (con un anticorpo specifico) e la quantificazione di una determinata proteina (antigene) presente all'interno di una miscela complessa di proteine separate in un gel di poliacrilammide in base al peso molecolare e immobilizzate su una membrana. È un saggio immunologico che combina l'elevato potere risolutivo dell'elettroforesi su gel con la specificità degli anticorpi e per questo è una metodica ad elevata sensibilità in grado di rivelare quantità di proteine anche dell'ordine di nanogrammi. Permette, quindi, di valutare l'espressione di una determinata molecola attraverso 4 fasi: I) estrazione delle proteine, II) elettroforesi sul gel di poliacrilammide (SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), III) *western blotting*, IV) analisi densitometrica delle immagini.

3.3.1 Preparazione dei lisati cellulari

Dalle cellule ottenute dalle colture, sono state raccolte aliquote da 5×10^5 cellule. Queste sono state in seguito centrifugate a 400g per 7 minuti e risospese in 20 μ l di PBS 1X (Euroclone), per poi essere lisate in 18 μ l del seguente tampone:

- 2% SDS (sodio dodecil solfato) (Sigma-Aldrich);
- 1% β -mercaptoetanololo (Sigma-Aldrich);
- Tris-HCl (tris idrossimetil amminometano cloridrato) 50mM, pH 6,8 (Sigma-Aldrich);
- EDTA (acido etilendiaminotetracetico) 5mM (Sigma-Aldrich);
- pironina (tracce);
- inibitori delle fosfatasi.

Successivamente, i lisati sono stati agitati al *vortex*, sottoposti ad una temperatura di 100°C per 5 minuti e, quindi, a corsa elettroforetica o a conservazione a -20°C per analisi successive.

3.3.2 Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS

L'elettroforesi è una tecnica che utilizza un supporto poroso, o gel, sottoposto ad un campo elettrico che permette di separare tra loro particelle cariche in base alla loro carica e peso molecolare. La carica delle molecole guida la direzione di migrazione (verso il catodo/polo negativo o verso l'anodo/polo positivo); la dimensione o il peso molecolare delle molecole e i pori del gel determinano la velocità di migrazione e la posizione sul gel al termine della corsa elettroforetica. L'elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS è uno dei metodi più usati per separare le proteine di una miscela sulla base del solo peso molecolare. Il SDS, infatti, è un detergente anionico che si lega saldamente alle proteine mascherandone la carica propria e provocandone la denaturazione. In presenza di un eccesso di SDS, per ogni grammo di proteina si legano circa 1,4g di detergente, fornendo alla proteina stessa una quantità di carica negativa costante per unità di massa. Pertanto, durante l'elettroforesi, tutti i complessi proteina-SDS si muovono verso l'anodo e, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, la loro mobilità risulta inversamente proporzionale al loro peso molecolare. Proteine con uguale peso molecolare si muoveranno formando delle bande omogenee e, facendo migrare proteine *standard* di peso molecolare noto contemporaneamente al campione, è possibile determinare il peso molecolare delle proteine presenti nel campione stesso.

Il gel di poliacrilamide in SDS è stato preparato seguendo il metodo di LaemmLi. La piastra elettroforetica è costituita da due tipi di gel:

- gel superiore o impaccatore (*stacking gel*) a pH 6,8: serve a concentrare le proteine del campione in modo tale che siano tutte allineate all'inizio della corsa elettroforetica;

- gel inferiore o di separazione (*running gel*) a pH 8,8: in questo gel avviene la vera e propria separazione delle proteine.

La piastra, delle dimensioni di 8x10cm, è stata poi fissata nell'apposito apparecchio Mighty Small-Se 250 Hoefer Scientific Instruments (Amersham Biosciences; Amersham, UK). Le proteine, nel nostro caso, sono state separate tramite corsa elettroforetica in gel di acrilamide alla concentrazione del 10%, per una durata di 2 ore circa e ad un'intensità di corrente costante di 25mA.

3.3.3 Western blotting

Dopo la corsa elettroforetica su gel, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa grazie all'azione di un campo elettrico, ottenuto applicando all'apposito apparecchio una corrente di 350mA per 2 ore e 30 minuti (Figura 8). Il tampone utilizzato per l'elettrotrasferimento (tampone di *blotting*) presenta la seguente composizione: Tris 25mM (Sigma-Aldrich), glicina 192mM (Sigma-Aldrich), 20% metanolo (Carlo Erba; Milano, Italia) e 0,1% SDS. Tale tampone, definito per comodità tampone A, presenta un pH finale di 8,0. Al termine del trasferimento, la membrana di nitrocellulosa è stata lasciata per 2 ore in agitazione nel tampone di saturazione (tampone B), composto da 5% BSA (albumina di siero bovino; Sigma-Aldrich), TBS 20X (Tris Buffered Saline, Tris-HCl 50mM a pH 7,5, NaCl 150mM; Sigma-Aldrich) e 0,1% TWEEN20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate; Sigma-Aldrich), che ha la funzione di saturare i siti di legame aspecifici, ovvero quei siti della membrana liberi da proteine a cui potrebbero legarsi in maniera aspecifica gli anticorpi e per questo creare interferenze con la lettura della membrana stessa.

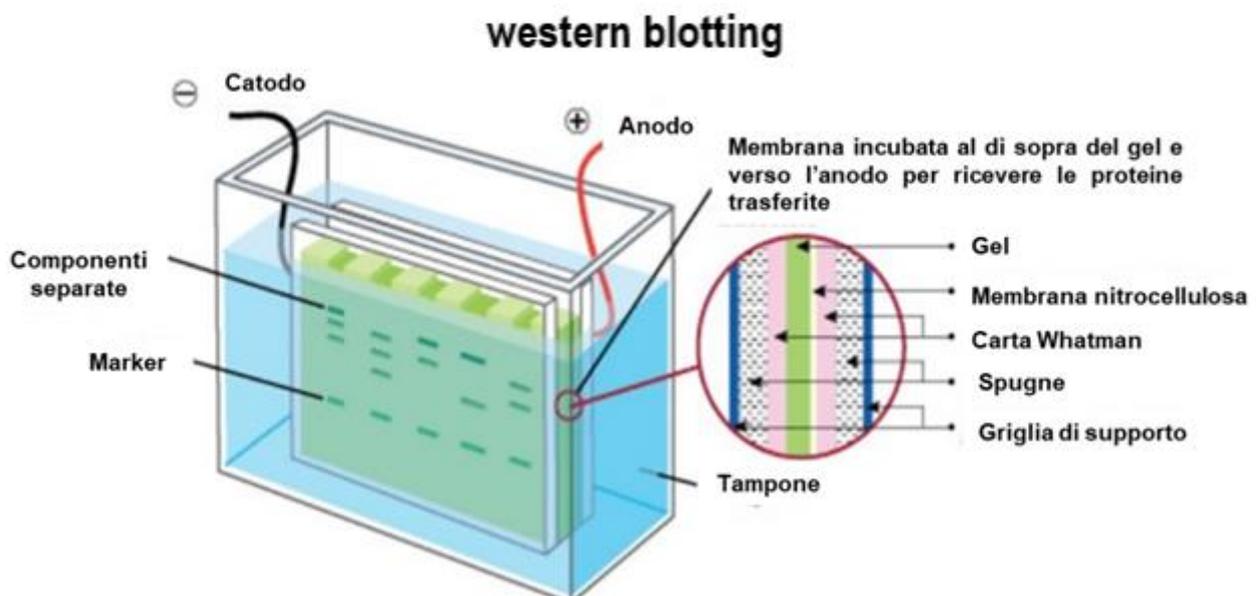


Figura 8. Schema generale della preparazione del western blotting. Il gel in cui sono separate le proteine viene inserito tra due strati di carta assorbente Whatman e a contatto con una membrana di nitrocellulosa sulla quale, al termine della procedura saranno trasferite e fissate le proteine. La struttura è inserita in supporti tra due spugne e immersa nell'apposito tampone.

È seguita l'incubazione, *overnight* a 4°C e in agitazione, con un anticorpo specifico diretto contro la proteina di interesse (anticorpo primario) diluito in un tampone (tampone C) costituito da TBS 20X e 1% BSA. Sono stati successivamente eseguiti tre lavaggi in agitazione, ciascuno di 10 minuti, a temperatura ambiente, utilizzando il tampone di lavaggio composto da TBS20X e 0,1% TWEEN20 (tampone B senza BSA), con l'obiettivo di eliminare l'anticorpo in eccesso che non ha legato il proprio antigene.

Per il nostro studio abbiamo utilizzato i seguenti anticorpi:

- Anti-MDR1 (Cell Signaling Technology; Danvers, Massachusetts)
- Anti-MEK1/2 (Cell Signaling Technology)
- Anti-MEK1/2-S217/221 (Cell Signaling Technology)
- Anti-p38 (Cell Signaling Technology)
- Anti-p38-T180/Y182 (Cell Signaling Technology)
- Anti-ERK (Cell Signaling Technology)
- Anti-ERK-Thr202/Tyr204 (Cell Signaling Technology)
- Anti-Src (Abcam; Cambridge, UK)
- Anti-Src-Tyr396 (Abcam)
- Anti-MKK3/6 S189/S207 (Cell Signaling Technology)
- Anti-MKK3 (Cell Signaling Technology)
- Anti-MKK6 (Cell Signaling Technology)
- Anti-β-actina (Sigma-Aldrich)
- Anti-GAPDH (Abcam)
- Anti-tubulina (Sigma-Aldrich)

In seguito, la membrana è stata incubata per 1 ora in agitazione con un anticorpo secondario anti-IgG (PerkinElmer; Waltham, Massachusetts), diretto in modo specifico contro l'anticorpo primario, coniugato con l'enzima perossidasi ed opportunamente diluito nel tampone C. Trascorsa l'ora di incubazione, sono stati eseguiti altri tre lavaggi, in seguito ai quali si è passati alla rivelazione anticorpale con il sistema *Enhanced ChemiLuminescence* (ECL) (Euroclone): la membrana è stata incubata per 1 minuto con 1mL di luminolo ed 1mL di H₂O₂ che entrano in contatto con la perossidasi coniugata al complesso Ag-Ac. Questo provoca una reazione di ossidazione alla quale segue l'emissione di luce che viene rivelata dall'apposito apparecchio *ImageQuant LAS 600* (GE Healthcare; UK). L'immagine mostra delle bande in corrispondenza della proteina di interesse che sono state acquisite e quantificate mediante densitometria, utilizzando il programma *Image J*. L'espressione delle proteine in esame è stata normalizzata sull'espressione di altre proteine di riferimento.

3.3.4 Analisi della proteina PARP per la valutazione dell'apoptosi

L'apoptosi è stata valutata mediante lo studio dell'espressione della proteina PARP (poli-ADP-ribosio polimerasi) con la tecnica del *western blotting*, utilizzando un anticorpo anti-PARP che permette di riconoscere sia la forma intera (116kDa), sia la forma clivata (89kDa). PARP, infatti, viene tagliata in due frammenti di 89 e 24kDa da proteasi attive durante l'apoptosi, in particolare dalla caspasi-3. Per questo motivo, il riscontro della forma tagliata di PARP di 89kDa, mediante l'utilizzo di uno specifico anticorpo, è indice di attivazione della caspasi-3 e dell'induzione del programma di morte cellulare.

4 RISULTATI

4.1 Valutazione della resistenza raggiunta dalle cellule MEC-1 durante il trattamento con Ibrutinib

Per valutare l'avvenuta induzione di resistenza ad Ibrutinib nelle linee cellulari sviluppate con il nostro metodo (vedi materiali e metodi), abbiamo raccolto campioni di cellule MEC-1#WT, MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10 dalle relative piastre di coltura e le abbiamo trattate con Ibrutinib 5 μ M, dose indicata dalla letteratura per indurre apoptosi *in vitro* nelle cellule di LLC. Per tutte le linee, dopo 72 ore di trattamento, abbiamo valutato il clivaggio della proteina PARP, indice di apoptosi, mediante *western blotting* (Figura 9).

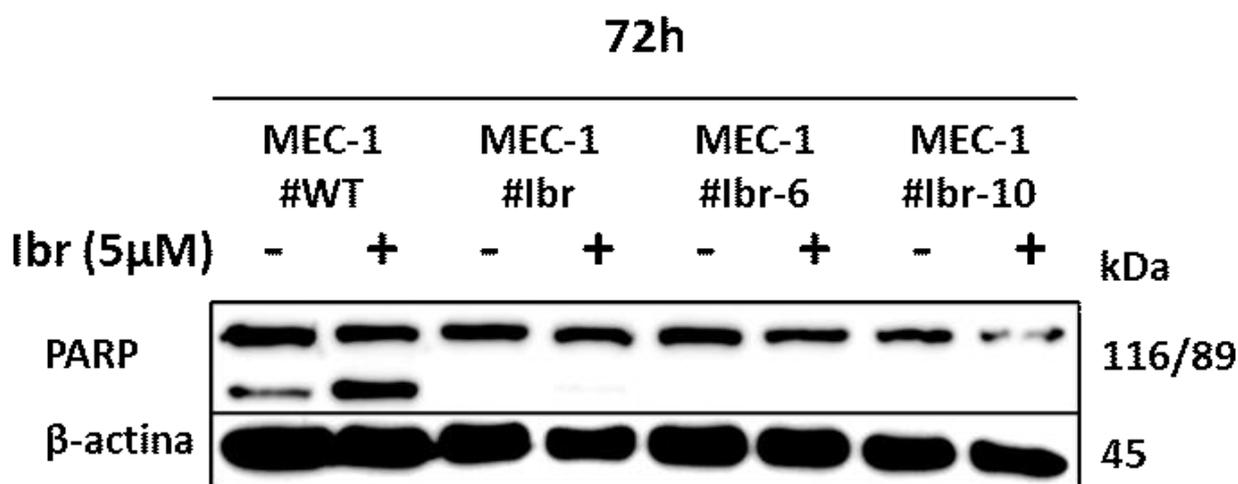


Figura 9. Valutazione dell'apoptosi tramite il clivaggio della proteina PARP. *Western blotting* rappresentativo che evidenzia l'aumento di apoptosi nelle cellule MEC-1#WT incubate per 72 ore con Ibrutinib a concentrazione 5 μ M rispetto alle linee MEC-1#Ibr MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10. I lisati totali delle cellule sono stati sottoposti ad SDS-PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rivelati in successione con Ac anti-PARP, per mettere in evidenza il taglio della proteina e quindi l'apoptosi, e anti- β -actina.

Nella Figura 9 si possono osservare i risultati ottenuti alle 72 ore di trattamento: nelle MEC-1#WT i livelli di proteina PARP clivata, indice di apoptosi, aumentano dopo il trattamento con una concentrazione di Ibrutinib 5 μ M, mentre nelle MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr10 non viene evidenziata la presenza di PARP clivata. Questo indica che le linee MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10 hanno sviluppato resistenza ad Ibrutinib, non andando incontro ad apoptosi quando esposte alla dose del farmaco che la induce *in vitro*. Nelle MEC-1#WT senza farmaco è comunque presente una piccola quantità di PARP clivata a causa dell'apoptosi dovuta allo stress subito dalle cellule.

4.2 Valutazione di MDR-1 nelle cellule resistenti

Il risultato precedente ha dimostrato che i cloni MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10 hanno sviluppato resistenza ad Ibrutinib. Abbiamo valutato anche l'espressione del fattore MDR-1 (*Multidrug resistance 1*) in queste cellule. MDR-1 funge da pompa di efflusso per composti xenobiotici con un'ampia specificità di substrato inclusi agenti terapeutici come actinomomicina D, etoposide, imatinib e doxorubicina, nonché molecole endogene. Studi di letteratura hanno dimostrato che MDR-1 riduce l'accumulo di farmaci nelle cellule tumorali, consentendo lo sviluppo della resistenza agli stessi^{23,24}. Abbiamo dimostrato che questa proteina è *over*-espressa nelle nostre linee cellulari con resistenza ad Ibrutinib, soprattutto nel clone MEC-1#Ibr e nel clone MEC-1#Ibr-10 (MEC-1#Ibr: $0,64 \pm 0,13$ – $**p < 0,01$; MEC-1#Ibr-6: $0,21 \pm 0,18$ – $p = ns$; MEC-1#Ibr-10: $1,01 \pm 0,32$ – $***p < 0,001$), rispetto alle cellule MEC-1#WT ($0,16 \pm 0,13$) con valori statisticamente significativi (test di Mann-Whitney, Figura 10).

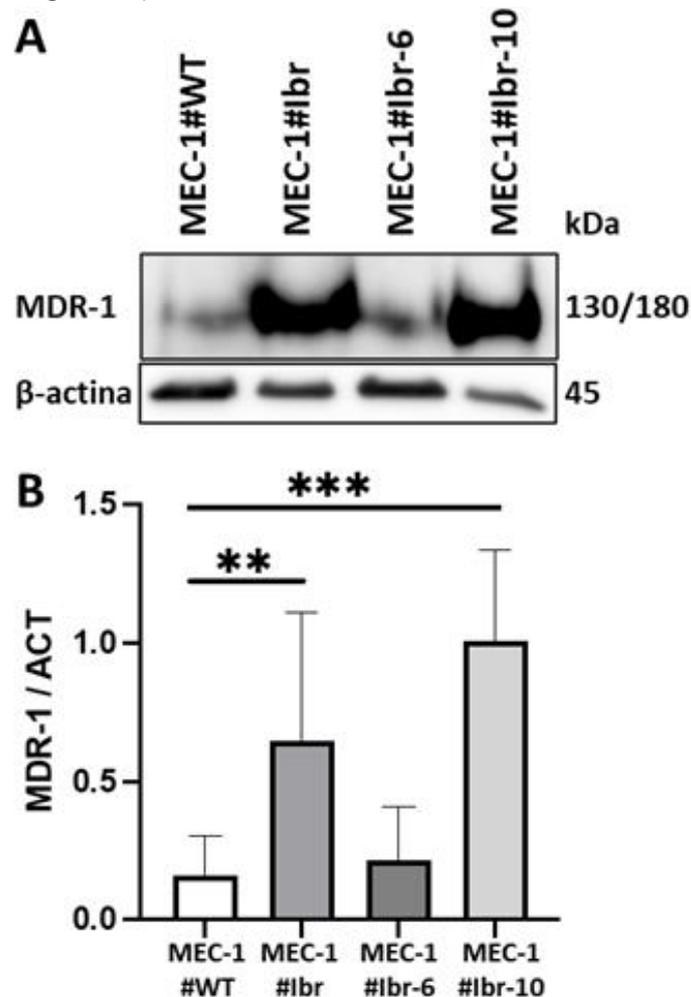


Figura 10. Analisi dell'espressione proteica di MDR-1 nelle linee cellulari resistenti. **A.** *Western blotting* rappresentativo dell'analisi dell'espressione di MDR-1 nelle linee cellulari MEC-1#WT, MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10. I lisati totali delle cellule sono stati sottoposti ad SDS-PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rivelati in successione con Ac anti-MDR1 e anti- β -actina. **B.** Istogrammi relativi all'analisi densitometrica di MDR-1/ β -actina dei casi analizzati. Gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato $**=p < 0,01$; $***=p < 0,001$; (test di Mann-Whitney rispetto alle MEC-1#WT).

4.3 Risultati ottenuti mediante “*membrane-based array*” sulle cellule MEC-1

Per interpretare i risultati ottenuti dall’*array* abbiamo eseguito un’analisi densitometrica e relativa normalizzazione. Nella Figura 11 sono riportati gli istogrammi relativi alle analisi condotte. Per ogni proteina *target*, i valori ottenuti per le tre linee resistenti (MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10) sono stati normalizzati sui valori ottenuti nella linea wild type (MEC#-1WT), posti uguali a 1. Nei grafici sono visibili gli istogrammi relativi alle 3 linee resistenti mentre i valori della linea MEC-1#WT sono rappresentati dalla linea blu continua, che interseca l’asse delle ordinate al valore $y=1$. In questo modo, gli istogrammi che superano il valore unitario rappresenteranno proteine *over*-espresse o iper-attivate rispetto al controllo *wild type*, viceversa gli istogrammi che non raggiungono il valore di 1 rappresenteranno proteine *down*-regolate o meno attivate rispetto al *wild type*. L’analisi proteica ha evidenziato numerosi *target* differenzialmente espressi nelle cellule resistenti rispetto alla linea *wild type*. I risultati emersi dall’analisi devono essere validati con una metodica di riferimento, come il *western blotting*, e la letteratura estensivamente revisionata per trovare indicazioni di possibili collegamenti fra le molecole coinvolte.

4.4 Validazione dei dati ottenuti dal “*membrane-based array*” mediante *western blotting*: analisi preliminari di alcune molecole

4.4.1 Via del segnale di MAPK

Dall’analisi proteica, nella resistenza ad Ibrutinib sembrano coinvolte molecole appartenenti alle vie del segnale mediate dal *pathway* delle MAP chinasi (Figura 11A). Dati preliminari da noi ottenuti in *western blotting* confermano il dato dell’*array* in questa direzione. Nello specifico, abbiamo validato, nelle linee cellulari MEC#-1WT, MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10, l’espressione di alcune proteine chiave coinvolte nel *pathway* delle MAPK quali le proteine: ERK1/2 fosforilata in T202/Y204, MEK1/2 fosforilata in S217/221, MKK3 fosforilata in S189, MKK6 fosforilata in S207 e p38 fosforilata in T180/Y182. L’espressione delle proteine fosforilate è stata normalizzata sulla proteina totale, rispettivamente ERK1/2, MEK1/2, MKK3, MKK6 e p38.

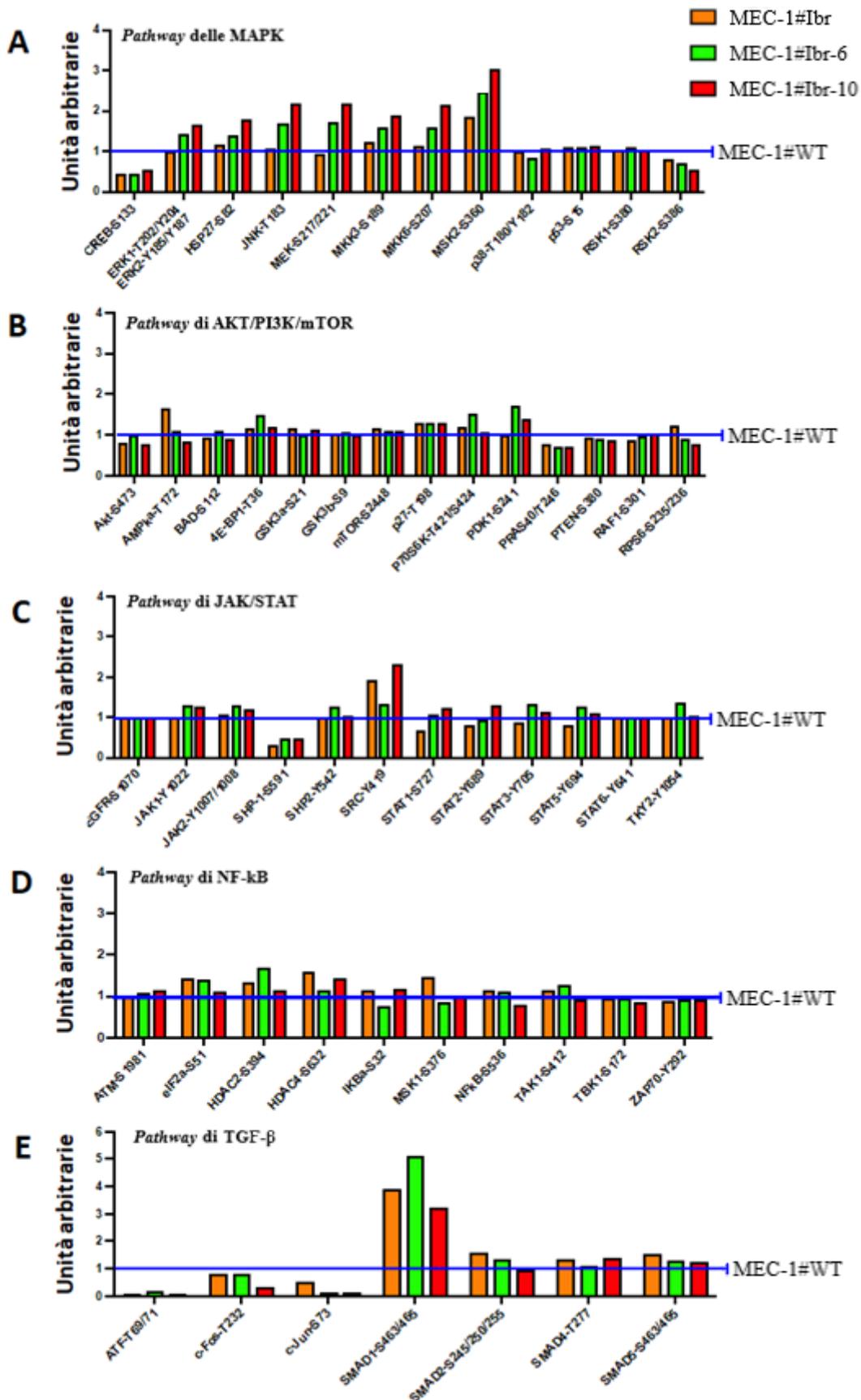


Figura 11. Risultati dell'analisi densitometrica dei risultati ottenuti con l'array RayBio® Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55. L'espressione delle proteine nelle linee MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 MEC-1#Ibr-10 è stata rapportata all'espressione proteica nelle cellule MEC-1#WT. Quest'ultima è considerata il valore di riferimento ($\gamma=1$, in tutti i grafici). S= Serina; T= Treonina; Y= Tirosina.

Le Figure 12, 13 e 14, riportano i *western blotting* rappresentativi e l'analisi densitometrica che dimostrano come queste molecole siano attivate nelle cellule resistenti rispetto alle WT. In particolare, MEK1/2-S217/221 è iper-attivata nelle cellule MEC-1#Ibr ($1,15 \pm 0,05$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($0,5 \pm 0,03$; * $p < 0,05$, test di Mann-Whitney)(Figura 12A). ERK1/2-T202/Y204 è iper-attivata nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $0,53 \pm 0,08$ - * $p < 0,05$; MEC-1#Ibr-6: $0,68 \pm 0,34$ - $p = ns$; MEC-1#Ibr-10: $0,97 \pm 0,43$ - * $p < 0,05$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($0,29 \pm 0,06$; test di Mann-Whitney) (Figura 12B). MKK6-S207 è iper-attivata nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $1,31 \pm 0,27$ - * $p < 0,05$; MEC-1#Ibr-6: $1,30 \pm 0,27$ - * $p < 0,05$; MEC-1#Ibr-10: $1,37 \pm 0,28$ - * $p < 0,05$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($0,75 \pm 0,24$; test di Mann-Whitney) (Figura 13A). MKK3-S189 è iper-attivata nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $1,10 \pm 0,12$ - * $p < 0,05$; MEC-1#Ibr-6: $1,33 \pm 0,10$ - * $p < 0,05$; MEC-1#Ibr-10: $1,07 \pm 0,16$ - $p = ns$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($0,91 \pm 0,07$; test di Mann-Whitney) (Figura 13B). p38-T180/Y182 è iper-attivata nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $1,02 \pm 0,11$ - ** $p < 0,01$; MEC-1#Ibr-6: $1,03 \pm 0,15$ - ** $p < 0,01$; MEC-1#Ibr-10: $0,89 \pm 0,20$ - $p = ns$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($0,76 \pm 0,31$; test di Mann-Whitney) (Figura 14A). Tutti i valori di p sono raccolti in tabella 1.

4.4.2 Src (Lyn)

L'analisi proteica ha evidenziato un'iper-attivazione della chinasi Src fosforilata in Y419 (figura 11C). La tirosin-chinasi Lyn è la Src-chinasi maggiormente rappresentata nella LLC essendo *over-espressa*, costitutivamente attivata e localizzata in maniera anomala nei linfociti B neoplastici rispetto a quelli normali¹⁵. Nella proteina Lyn il sito di fosforilazione corrispondente a quello della Src-Tyr419 è la tirosina 396 e l'Ac utilizzato (anti-Src-Tyr419) può *cross-reagire* con altri membri della famiglia Src (in questo caso Lyn) quando fosforilati nei siti equivalenti, come dimostrato dalla rivelazione anticorpale che evidenzia due bande del peso molecolare di Lyn (53/56kDa, Figura 14B). Abbiamo quindi dimostrato che Lyn-Tyr396 è iper-attivata nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $0,75 \pm 0,04$ - * $p < 0,05$; MEC-1#Ibr6: $1,09 \pm 0,07$ - * $p < 0,05$; MEC-1#Ibr-10: $1,08 \pm 0,31$ - * $p < 0,05$) rispetto alle cellule MEC-1#WT, dove la molecola non è fosforilata ($0,00 \pm 0,00$; test di Mann-Whitney).

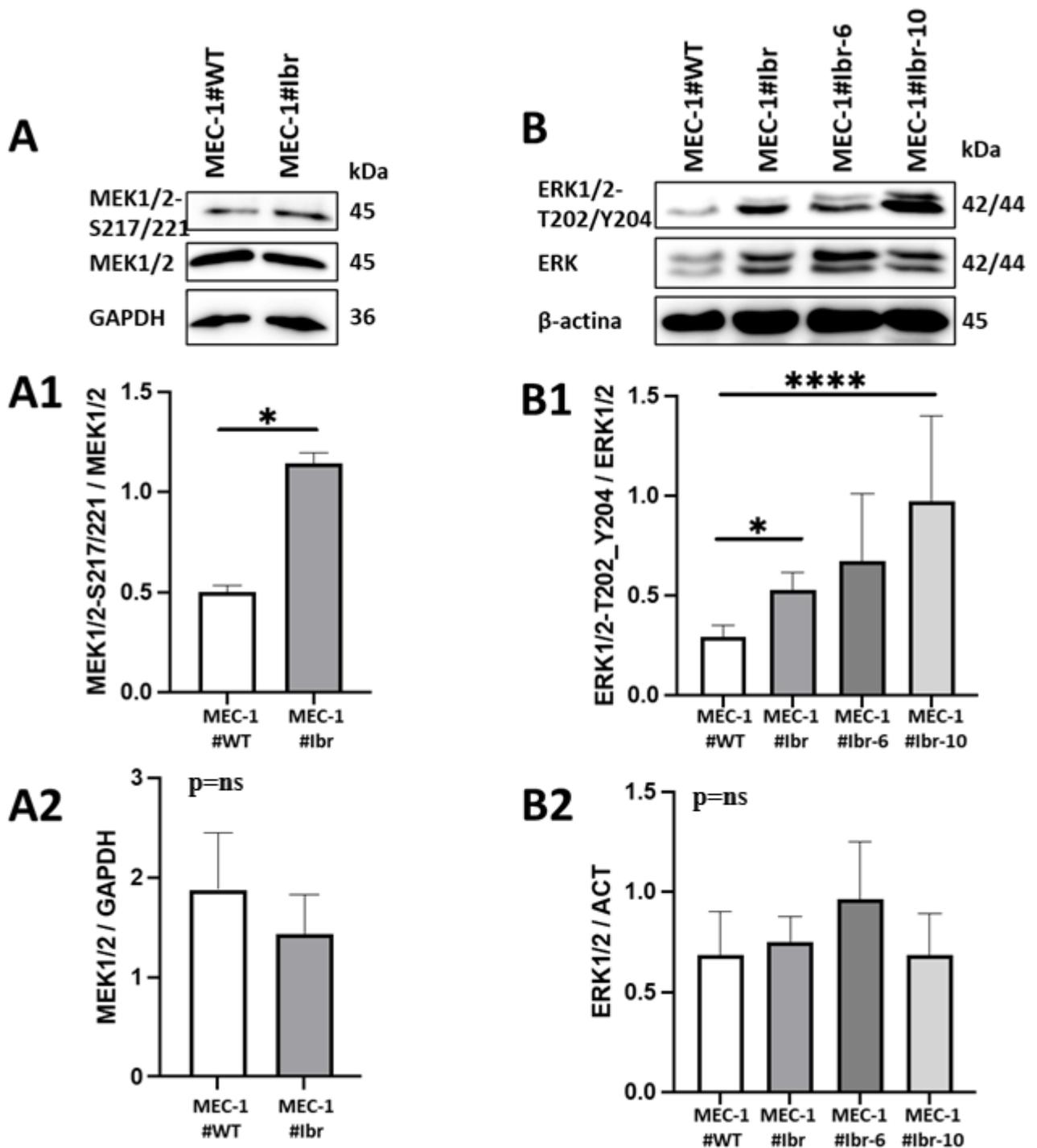


Figura 12. Validazione tramite *western blotting* dell'espressione di MEK1/2-S217/221 (A) ed ERK1/2-T202/Y204 (B) nelle linee cellulari resistenti. *Western blotting* rappresentativi dell'analisi dell'espressione di MEK1/2-S217/221 ed ERK1/2-T202/Y204 nelle linee cellulari MEC-1#WT, MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10 (A e B). I lisati totali delle cellule sono stati sottoposti ad SDS-PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rivelati in successione con Ac anti-MEK, anti-ERK e anti- β -actina. **A1,A2,B1,B2.** Istogrammi relativi all'analisi densitometrica di MEK1/2-S217/221 ed ERK1/2-T202/T204 normalizzate su MEK1/2 ed ERK1/2, rispettivamente (A1 e B1). Istogrammi relativi all'analisi densitometrica di MEK1/2 ed ERK1/2 normalizzate su GAPDH e β -actina, rispettivamente (A2 e B2). Gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato. *= $p < 0,05$, ****= $p < 0,0001$; (test di Mann-Whitney rispetto alle MEC-1#WT). S= serina; T= treonina.

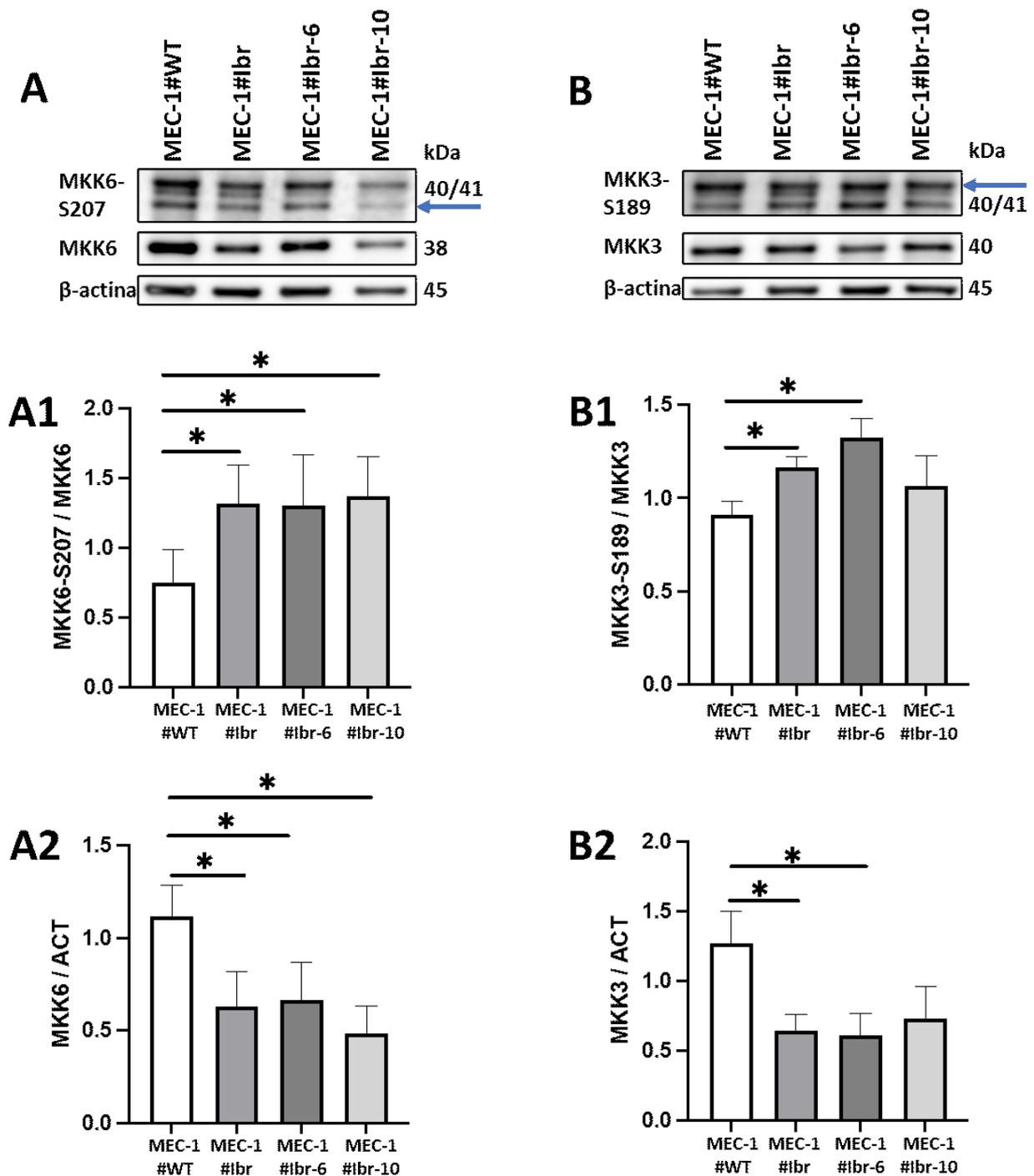


Figura 13. Validazione tramite *western blotting* dell'espressione di MKK6-S207 (A) ed MKK3-S189 (B) nelle linee cellulari resistenti. *Western blotting* rappresentativi dell'analisi dell'espressione di MKK6-S207 e MKK3-S189 nelle linee cellulari MEC-1#WT, MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10. Le frecce blu indicano le bande relative a MKK6 (A) e MKK3 fosforilate (B), rispettivamente (A e B). I lisati totali delle cellule sono stati sottoposti ad SDS-PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rivelati in successione con Ac anti-MKK3, anti-MKK6 e anti- β -actina. **A1,A2,B1,B2.** Istogrammi relativi all'analisi densitometrica di MKK6-S207 ed MKK3-S189 normalizzate su MKK6 ed MKK3, rispettivamente (A1 e B1). Istogrammi relativi all'analisi densitometrica di MKK6 ed MKK3 normalizzate su β -actina (A2 e B2). Gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato. *= $p < 0,05$ (test di Mann-Whitney rispetto alle MEC-1#WT). S= serina.

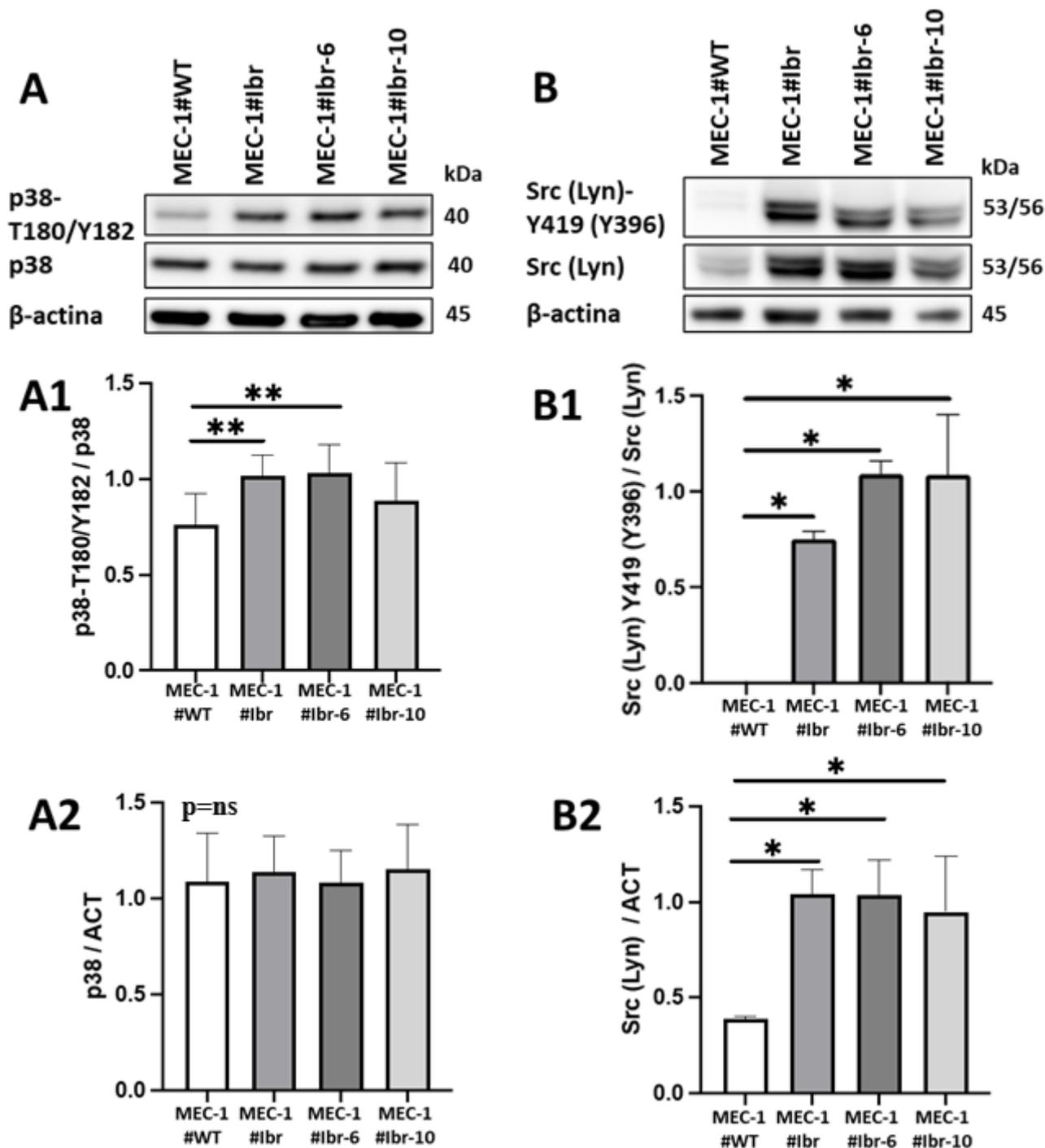


Figura 14. Validazione tramite *western blotting* dell'espressione di p38-T180/Y182 (A) e Src(Lyn)-Y419(Y396) (B) nelle linee cellulari resistenti. *Western blotting* rappresentativi dell'analisi dell'espressione di p38-T180/Y182 e Src(Lyn)-Y419(Y396) nelle linee cellulari MEC-1#WT, MEC-1#lbr, MEC-1#lbr-6 e MEC-1#lbr-10 (A e B). I lisati totali delle cellule sono stati sottoposti ad SDS-PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rivelati in successione con Ac anti-p38, anti-Src(Lyn) e anti-β-actina. **A1,A2,B1,B2.** Istogrammi relativi all'analisi densitometrica di p38-T180/Y182 e Src(Lyn)-Y419(Y396) normalizzate su p38 e Src(Lyn), rispettivamente (A1 e B1). Istogrammi relativi all'analisi densitometrica di p38 e Lyn normalizzate su β-actina (A2 e B2). Gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ (test di Mann-Whitney rispetto alle MEC-1#WT). T= treonina; Y= tirosina.

Inoltre, grazie al *western blotting*, siamo stati in grado di valutare non solo l'attivazione ma anche l'espressione proteica delle proteine sopra elencate, trovando delle differenze significative tra le cellule resistenti rispetto alle MEC-1#WT. In particolare, abbiamo osservato che MKK6 è *down-regolata* nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $0,63 \pm 0,19$ - $*p < 0,05$; MEC-1#Ibr-6: $0,66 \pm 0,20$ - $*p < 0,05$; MEC-1#Ibr-10: $0,49 \pm 0,14$ - $*p < 0,05$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($1,12 \pm 0,16$; test di Mann-Whitney) (Figura 13A). Anche MKK3 è *down-regolata* nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $0,64 \pm 0,12$ - $*p < 0,05$; MEC-1#Ibr-6: $0,61 \pm 0,16$ - $*p < 0,05$; MEC-1#Ibr-10: $0,73 \pm 0,23$ - $p = ns$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($1,27 \pm 0,23$; test di Mann-Whitney) (Figura 13B). Al contrario, la chinasi Lyn è *over-espressa* nelle cellule resistenti (MEC-1#Ibr: $1,04 \pm 0,12$ - $*p < 0,05$; MEC-1#Ibr-6: $1,04 \pm 0,18$ - $*p < 0,05$; MEC-1#Ibr-10: $0,95 \pm 0,29$ - $*p < 0,05$) rispetto alle cellule MEC-1#WT ($0,95 \pm 0,29$; test di Mann-Whitney) (Figura 14B).

Tabella1. Valori p dei cloni cellulari MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10 rispetto alle linee MEC-1#WT.

Anticorpo utilizzato	p rispetto alle linee MEC-1#WT		
	MEC-1#Ibr	MEC-1#Ibr-6	MEC-1#Ibr-10
MDR-1	$p < 0,01$	$p = ns$	$p < 0,001$
MEK 1/2 - S217/221	$p < 0,05$	/	/
MEK 1/2 totale	$p = ns$	/	/
ERK 1/2 - T202/Y204	$p < 0,05$	$p = ns$	$p < 0,05$
ERK 1/2 totale	$p = ns$	$p = ns$	$p = ns$
MKK3 - S189	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p = ns$
MKK3 totale	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p = ns$
MKK6 - S207	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
MKK6 totale	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
p38 - T180/Y182	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p = ns$
p38 totale	$p = ns$	$p = ns$	$p = ns$
Lyn - Tyr 396	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Lyn totale	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi è stato l'identificazione di *marker* di resistenza al farmaco Ibrutinib nelle cellule di Leucemia Linfatica Cronica (LLC) mediante una tecnica di *membrane-based array*, e successiva validazione del risultato. I risultati preliminari ottenuti hanno evidenziato come alcune proteine, quelle appartenenti alla via delle MAPK *in primis*, sono maggiormente espresse nelle cellule resistenti ad Ibrutinib e potrebbero quindi rappresentare dei *target* terapeutici utilizzabili per lo sviluppo di nuovi farmaci contro la LLC.

Nonostante gli enormi progressi e le recenti scoperte fatte dalla ricerca farmacologica, la LLC rimane una malattia incurabile. Negli ultimi anni sono state sviluppate nuove terapie a bersaglio molecolare^{25,26}, tra cui Ibrutinib, inibitore di Btk, il cui utilizzo ha determinato significativi tassi di risposta sia nei pazienti a prognosi sfavorevole non precedentemente trattati che in quelli recidivati/refrattari dopo chemio-immunoterapia modificando, in maniera positiva, la gestione e la storia clinica dei pazienti con LLC²⁷⁻²⁹.

Nonostante l'efficacia di Ibrutinib, il tasso di interruzione della terapia è sempre maggiore a causa dello sviluppo di resistenza al trattamento che si manifesta con l'evidenza di progressione clinica in corso di terapia. Due sono i principali meccanismi finora noti che antagonizzano l'azione di Ibrutinib: l'incapacità del farmaco di inibire la chinasi bersaglio e l'attivazione costitutiva della via di segnale a valle. Nell'80-85% dei casi, in particolare, lo sviluppo di resistenza a Ibrutinib è dovuto a mutazioni a carico di Btk e/o della proteina PLC γ , effettore a valle di Btk^{18,30}. Rimane un 15-20% dei casi in cui il meccanismo patogenetico non è ancora stato individuato, motivo per cui la ricerca in questo campo prosegue attivamente. Recentemente, il gruppo di Gandhi³¹ ha sviluppato delle linee cellulari che sovraesprimono Btk *wild type* o mutato in modelli *in vitro* e *in vivo* per "imitare" le cellule sensibili e resistenti ad Ibrutinib. Queste linee cellulari verranno impiegate per la caratterizzazione delle resistenze dovute alle mutazioni di Btk e per testare nuovi inibitori di Btk. Questo studio non valuta tuttavia quei pazienti che sviluppano resistenza ad Ibrutinib ma che non presentano mutazioni di Btk o PLC γ .

In quest'ottica di ricerca, in questa tesi ci siamo posti l'obiettivo di sviluppare una linea cellulare rappresentativa dei linfociti B di LLC che fosse Ibrutinib-resistente ma non presentasse mutazioni di Btk o PLC γ . Per ottenere questo risultato, abbiamo somministrato concentrazioni crescenti di farmaco alla linea cellulare MEC-1 che, seppure con alcuni limiti, è riconosciuta dalla letteratura come modello dei linfociti B neoplastici di LLC^{21,22}, tentando così di simulare le condizioni di resistenza che si verificano in quei pazienti che, *in vivo*, non rispondono al trattamento. Abbiamo verificato l'assenza di mutazioni di Btk e PLC γ in queste cellule per avere la certezza che la resistenza non sia

da attribuirsi ad esse. I nostri esperimenti si sono concentrati sulle 4 linee cellulari ottenute: le cellule *wild type* (MEC-1#WT) e i cloni Ibrutinib-resistenti MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6, MEC-1#Ibr-10.

Abbiamo valutato l'apoptosi nelle quattro linee trattate per 72 ore con Ibrutinib 5 μ M, concentrazione che, secondo la letteratura, causa apoptosi *in vitro* nelle cellule di LLC. A questo scopo, abbiamo ricercato l'espressione di PARP clivata tramite *western blotting* osservando che solo le cellule della linea MEC-1#WT andavano incontro ad apoptosi, mentre nelle linee MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10 non si è evidenziato alcun aumento della PARP clivata. Questo risultato ci ha permesso di confermare l'ottenuta resistenza osservata con il calcolo della *Fold Resistance*. Inoltre, le linee resistenti presentavano anche una maggiore espressione della proteina MDR-1, *marker* di sviluppo di resistenza ai farmaci^{23,24}.

Abbiamo quindi comparato l'attivazione di diverse vie del segnale nelle linee resistenti ad Ibrutinib e nella linea *wild type*, al fine di comprendere al meglio la biologia sottostante lo sviluppo della resistenza. In particolare, mediante uno studio di *membrane-based array* abbiamo eseguito un'analisi proteica dei *pathway* MAPK, AKT/PI3K/mTOR, JAK/STAT, NF-Kb e TGF- β . Questo tipo di analisi a largo spettro non può essere considerata definitiva, ma può dare delle indicazioni sull'attivazione di particolari proteine e *pathway* intracellulari su cui focalizzare le indagini. Abbiamo così individuato diverse molecole differenzialmente espresse nelle cellule resistenti rispetto alle cellule *wild type*, *in primis* molecole appartenenti alla via del segnale del MAPK. Tra le altre, abbiamo visto che le proteine ERK1/2-T202/Y204, MEK-S217/221, MKK3-S189, MKK6-S207, MSK2-S360, Src-Y419 e SMAD1-S245/250/255 sono iper-attivate nelle cellule resistenti rispetto a quelle *wild type* mentre SHP-1-S591 è *down-regolata* nelle prime rispetto alle seconde. Nel contesto di questa tesi, abbiamo iniziato a validare i dati ottenuti dall'*array* mediante *western blotting* su una serie di molecole, a cominciare da quelle del *pathway* delle MAPK, perché si tratta di molecole implicate nella crescita cellulare, nella differenziazione e nella risposta allo stress³².

È noto, infatti, che le molecole coinvolte in questa via del segnale sono, nel complesso, costitutivamente fosforilate e attivate nella LLC, e maggiormente attivate in quei pazienti che presentano fattori prognostici associati ad un *outcome* negativo^{33,34}. I dati di validazione da noi ottenuti dimostrano che, rispetto alla linea MEC-1#WT, nelle linee MEC-1#Ibr, MEC-1#Ibr-6 e MEC-1#Ibr-10 vi è una complessiva maggiore espressione e attivazione di numerose MAPK, quali ERK1/2-T202/Y204, MEK-S217/221, MKK3-S189, MKK6-S207. A differenza dell'*array*, abbiamo trovato iper-attivata nelle cellule resistenti anche la chinasi p38 al sito T180/Y182, risultato in linea con uno studio da noi precedentemente condotto su cellule ottenute da pazienti con LLC³⁵.

Abbiamo validato anche i dati ottenuti sulle proteine Src-Y419. Lyn è la Src-chinasi più rappresentata nella LLC, dove è espressa in maniera anomala contribuendo alla difettiva apoptosi

delle cellule leucemiche¹². Per questo, la chinasi Lyn rappresenta un buon *target* terapeutico per la LLC, e la sua *over*-espressione nelle cellule resistenti lo conferma. Inoltre, un risultato da tenere in considerazione, anche se non ancora validato, riguarda la *down*-regolazione della tirosin-fosfatasi SHP-1 fosforilata in S591. Nella LLC, questa fosfatasi risulta separata in due compartimenti, uno a livello della membrana plasmatica e uno citosolico. SHP-1, a livello della membrana plasmatica, è fosforilata da Lyn, viene così inibita e non può a sua volta più inibire le proteine che promuovono segnali proliferativi e di sopravvivenza cellulare³⁶⁻³⁸. Dall'analisi densitometrica dell'*array* eseguito si osserva una notevole riduzione dell'espressione di SHP-1-S591 nelle linee resistenti (soprattutto MEC-1#Ibr e MEC-1#Ibr-10) rispetto alla linea MEC-1#WT e tale dato andrà sicuramente approfondito vista l'importanza di questa fosfatasi e della sua interazione con Lyn nella LLC. Molecole attivatrici di SHP-1, come Nintedanib, sono già state proposte per un loro utilizzo in strategie terapeutiche contro la LLC³⁸.

Complessivamente, i risultati ottenuti dall'analisi proteica condotta sulle linee MEC-1 resistenti hanno messo in evidenza l'iperattivazione della via delle MAPK e di molecole ad esse associate grazie al *cross-talk* con altri *pathway*. Una ricerca pubblicata dal nostro gruppo ha evidenziato che l'inibizione, via MAPK, dell'asse HSP70/HSF1, è importante per indurre l'apoptosi nelle cellule di LLC di pazienti risultati resistenti a regimi terapeutici *in vivo* con Ibrutinib³⁹. Queste vie andranno quindi sviscerate nell'ottica di trovare *target* terapeutici da colpire con molecole nuove o, possibilmente, mediante l'uso di farmaci già sviluppati per altre patologie (le cosiddette "*repurposing drugs*"), da soli o in combinazione con Ibrutinib stesso.

6 BIBLIOGRAFIA

- 1) Hallek M, Cheson BD, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;31:2745-2760.
- 2) Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33:240-249.
- 3) Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1017-1029.
- 4) Caligaris-Cappio F, Gobbi M, et al. Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1982;155:623-628.
- 5) Oscier D, Else M, et al. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. 2016;174:767-775.
- 6) Smolewski P, Witkowska M, et al. A. New insights into biology, prognostic factors, and current therapeutic strategies in chronic lymphocytic leukemia. *ISRN Oncol*. 2013;2013:740615.
- 7) Rampazzo E, Bonaldi L, et al. Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *A. Haematologica*. 2012;97:56-63.
- 8) Redaelli A, Laskin BL, et al. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care*. 2004;13:279-287.
- 9) Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:145-162.
- 10) Stall AM, Fariñas MC, et al. Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:7312-7316.
- 11) Yang J, Reth M. Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells. *Nature*. 2010;467:465-469.
- 12) Contri A, Brunati AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. 2005;115:369-378.
- 13) Herman SE, Gordon AL, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117:6287-6296.
- 14) Muzio M, Apollonio B, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112:188-195.

- 15) Chen L, Apgar J, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105:2036-2041.
- 16) Ahn IE, Brown JR et al. Targeting Bruton's Tyrosine Kinase in CLL. *Front Immunol*. 2021;12:687458.
- 17) Herman SE, Mustafa RZ, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF- κ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. 2014;123:3286-3295.
- 18) Kaur V, Swami A. Ibrutinib in CLL: a focus on adverse events, resistance, and novel approaches beyond ibrutinib. *Ann Hematol*. 2017;96:1175-1184.
- 19) Ahn IE, Underbayev C, et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017;129:1469-1479.
- 20) Maddocks KJ, Ruppert AS, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol*. 2015;1:80-87.
- 21) Stacchini A, Aragno M, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res*. 1999;23:127-136.
- 22) Quentmeier H, Pommerenke C, et al. The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. *Sci Rep*. 2019;9:8218.
- 23) Chen CJ, Chin JE, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*. 1986;47:381-389.
- 24) Kartner N, Shales M, et al. Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res*. 1983;43:4413-4419.
- 25) Delgado J, Nadeu F, et al. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*. 2020;105:2205-2217.
- 26) Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15:510-527.
- 27) Burger JA, Tedeschi A, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373:2425-2437.
- 28) Farooqui MZH, Valdez J, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:169-176.
- 29) Byrd JC, Furman RR, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369:32-42.
- 30) Maddocks KJ, Ruppert AS, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol*. 2015;1:80.

- 31) Aslan B, Kismali G, et al. Development and characterization of prototypes for in vitro and in vivo mouse models of ibrutinib-resistant CLL. *Blood Adv.* 2021;5:3134-3146.
- 32) Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002;12:9-18.
- 33) Shukla A, Shukla V, et al. Regulation of MAPK signaling and implications in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2018;59:1565-1573.
- 34) Giménez N, Martínez-Trillos A, et al. Mutations in the RAS-BRAF-MAPK-ERK pathway define a specific subgroup of patients with adverse clinical features and provide new therapeutic options in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2019;104:576-586.
- 35) Frezzato F, Raggi F, et al. HSP70/HSF1 axis, regulated via a PI3K/AKT pathway, is a druggable target in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer.* 2019;145:3089-3100.
- 36) Severin F, Frezzato F, et al. In Chronic Lymphocytic Leukemia the JAK2/STAT3 Pathway Is Constitutively Activated and Its Inhibition Leads to CLL Cell Death Unaffected by the Protective Bone Marrow Microenvironment. *Cancers.* 2019;11:1939.
- 37) Tibaldi E, Brunati AM, et al. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 2011;25:1768-1781.
- 38) Tibaldi E, Pagano MA, et al. Targeted activation of the SHP-1/PP2A signaling axis elicits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica.* 2017;102:1401-1412.
- 39) Frezzato F, Visentin A, et al. Targeting of HSP70/HSF1 Axis Abrogates In Vitro Ibrutinib-Resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers.* 2021;13:5453.