



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA “LA SAPIENZA”

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE XXXII CICLO

Direttore: Chiar.ma Prof.ssa Isabella Screpanti

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

***Notch3 sostiene CXCR4 in membrana come meccanismo nella
progressione della leucemia T-ALL***

***Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa Maria Pia Felli***

***Dottorando:
Dott.ssa Georgia Tsaouli***

Anno Accademico 2018-2019

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. DIFFERENZIAMENTO DEI TIMOCITI.....	3
1.1 Maturazione e migrazione delle cellule T nei diversi compartimenti del timo	10
2. LE CHEMOCHINE E I LORO RECETTORI.....	11
3. CXCR4 NEL DIFFERENZIAMENTO INTRATIMICO.....	21
4. LA FAMIGLIA DELLE ARRESTINE ED IL LORO RUOLO NELL' INTERNA- LIZZAZIONE DI CXCR4.....	26
5. LA FAMIGLIA DEI GENI NOTCH.....	28
5.1 Struttura dei recettori Notch e dei loro ligandi.....	29
5.2 La via di segnalazione di Notch	32
5.3 Il recettore Notch e il suo ruolo nel differenziamento delle cellule T.....	37
5.4 Il topo transgenico per Notch3 come modello della leucemia linfoblastica acuta a cellule T.....	40
5.5 Alterazioni d'organo nel topo N3-IC Tg.....	43
6. ARRESTINA E NOTCH.....	45
SCOPO DEL LAVORO	46
MATERIALI E METODI	49
RISULTATI E DISCUSSIONE	54
CONCLUSIONI	73
BIBLIOGRAFIA	75

Abstract

Sebbene l'iperattivazione del signaling di Notch è associata allo sviluppo della leucemia linfoblastica acuta a cellule T, i meccanismi che sono alla base della diffusione delle "cellule pre-leucemiche" non sono ancora ben chiari. Obiettivo del nostro lavoro è stato quello di identificare le potenziali "cellule pre-leucemiche" e quali possono essere i meccanismi che guidano la loro diffusione. I nostri studi sono stati effettuati utilizzando topi transgenici che sovraesprimono il dominio intracellulare attivo di Notch3. In questo modello murino abbiamo osservato un aumento progressivo ed anomalo delle cellule T CD4⁺CD8⁺ nel sangue e poi nel midollo osseo. Queste cellule erano inoltre caratterizzate da un'elevata espressione in membrana dei recettori Notch3 e CXCR4. Il trapianto di tali cellule rivela la loro competenza nell'infiltrare la milza ed il midollo osseo di topi riceventi immuno-compromessi. Inoltre, i nostri dati *in vitro*, ottenuti con linee cellulari di leucemia umana T, dimostrano che l'espressione in superficie di CXCR4 è fondamentale per la capacità migratoria delle cellule CD4⁺CD8⁺, e che tale espressione è regolata da Notch3 attraverso la b-arrestina. Vista l'anomala fuoriuscita di tali cellule dal timo nelle prime fasi della leucemia, abbiamo effettuato esperimenti con un antagonista del recettore CXCR4, l'AMD3100. L'antagonismo *in vivo* del recettore impedisce la colonizzazione del midollo osseo da parte di tali cellule CD4⁺CD8⁺Notch3⁺CXCR4⁺ nei topi transgenici per Notch3, evidenziando ulteriormente l'importanza del recettore CXCR4 nella propagazione ed infiltrazione delle cellule CD4⁺CD8⁺. Quindi, l'iperespressione dei due recettori, Notch3 e CXCR4, su queste cellule T CD4⁺CD8⁺ "pre-leucemiche" probabilmente gioca un ruolo importante nelle fasi iniziali della progressione della malattia, contribuendo alla loro propagazione ed infiltrazione in organi linfoidi. Infine, i nostri dati suggeriscono che terapie combinate che contrastino precocemente il crosstalk intratimico Notch3/CXCR4, possano impedire la diffusione di cellule "pre-leucemiche" CD4⁺CD8⁺ e la progressione della malattia.

INTRODUZIONE

Le cellule che compongono il sistema immunitario sono di norma presenti come cellule circolanti nel sangue e nella linfa, come cellule disseminate in tutti i tessuti e come agglomerati anatomicamente definiti negli organi linfoidi.

Tutte le cellule che circolano nel sangue originano da un progenitore pluripotente comune presente nel midollo osseo: la cellula staminale ematopoietica. In seguito a maturazione, il progenitore della linea eritroide genererà globuli rossi e megacariociti; una seconda cellula staminale porterà alla formazione di monociti/macrofagi, cellule dendritiche, granulociti e mastociti (linea mieloide). Infine il terzo tipo: il progenitore linfoide comune, dà origine ai globuli bianchi della linea linfoide, linfociti B e T e le più grosse cellule NK.

Oltre a circolare nel sangue i linfociti si raccolgono in tessuti specializzati noti come tessuti linfoidi o organi linfoidi; tali tessuti possono essere classificati in due gruppi. Negli organi linfoidi primari (o centrali), categoria alla quale appartengono il midollo osseo e il timo, i linfociti si originano e maturano raggiungendo uno stato di competenza funzionale; in questi organi, qualora i linfociti dovessero riconoscere antigeni autologhi, verrebbero direttamente eliminati e inattivati.

Tutti gli altri tessuti, quali la milza, le adenoidi, i linfonodi, il tessuto linfoide associato alle mucose e il sistema immunitario cutaneo, sono definiti organi linfoidi secondari (o periferici) e rappresentano il luogo d'incontro tra i linfociti già maturi, circolanti nel sangue, con gli antigeni estranei trasportati dal sito d'infezione.

1. DIFFERENZIAMENTO DEI TIMOCITI

I linfociti si compongono quindi di sotto-popolazioni distinte, molto diverse nelle loro funzioni: i linfociti B, uniche cellule in grado di produrre anticorpi e i linfociti T i quali hanno come organo linfoide primario cruciale per il proprio sviluppo il timo.

La funzionalità e le dimensioni del timo diminuiscono nell'adulto a causa di un fenomeno noto come "involuzione timica" (Rodewald 2008; Boyd et al., 1993).

Anatomicamente il timo murino possiede una struttura bi-lobata (differendo così da quello umano multi-lobulare); strutturalmente è suddiviso in una corteccia esterna e una medulla interna, due regioni funzionalmente distinte che contribuiscono in modo specifico al differenziamento delle cellule T.

Il timo differisce dagli altri organi linfoidei poiché mentre questi ultimi sono di origine mesodermica, esso ha sia origini ectodermiche che endodermiche in accordo con la natura epiteliale delle cellule stromali timiche.

Le cellule epiteliali timiche, presenti sia nella corteccia che nella medulla, formano un network tridimensionale interconnesso dai desmosomi che permette la migrazione delle cellule T attraverso lo stroma e facilita un intimo contatto superficiale tra le cellule stromali ed i timociti. Di fatto, lo stroma crea distinti microambienti ciascuno contenente nicchie specializzate che regolano gli stadi sequenziali della maturazione. Un ulteriore ruolo delle cellule epiteliali è quello di produrre un'altra importante regione del microambiente timico che è la matrice extracellulare (ECM), importante per l'integrità del tessuto, la divisione del timo in lobi e per favorire ulteriormente la proliferazione, il differenziamento e la migrazione delle cellule T. Oltre alle cellule epiteliali, il timo contiene anche cellule stromali non epiteliali, cellule ematopoietiche derivanti dal midollo osseo quali macrofagi, cellule presentanti l'antigene e fibroblasti; tutte queste tipologie vanno ad integrarsi in una rete. Il complesso viaggio dei timociti attraverso il timo è essenziale per l'appropriato sviluppo delle cellule T. I passaggi di maturazione sono guidati dalle interazioni dei timociti con il microambiente e controllate dall'espressione di chemochine, una famiglia di proteine che coordinano la chemiotassi. Sono espresse in modo differente dalle cellule epiteliali della corteccia e della medulla e la loro azione si esplica sia quando sono legate sulla superficie cellulare, che quando sono secrete nel microambiente, generando un gradiente nella matrice extracellulare (ECM). Per contro, i timociti rispondono tramite l'espressione di recettori per le chemochine che, permettono loro la risposta chemotattica all'espressione locale del ligando, favorendo così la migrazione da un microambiente all'altro (Halkias et al., 2014).

I progenitori delle cellule T derivano dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo e viaggiano attraverso il circolo sanguigno per raggiungere il timo, dove entrano a livello di una ristretta regione della corteccia perimidollare (giunzione corticomidollare), mantenendo un costante apporto di progenitori per sostenere la timopoiesi (Lind et al., 2001). Durante il differenziamento i timociti migrano attraversando la corteccia subcapsulare, la corteccia profonda, la giunzione cortico-midollare (CMJ) e infine la medulla (**FIG.1**).

Il transito delle cellule nel timo è guidato da un recettore per le chemochine, CXCR4 (*chemokine receptor 4*), espresso sulla superficie dei timociti dallo stadio DN1 a DP suggerendo un ruolo rilevante nelle transizioni tra queste fasi (Plotkin et al., 2003). Il suo

ligando, CXCL-12 o SDF1 α (*stromal cell-derived factor1 α*), è espresso da una particolare sotto-popolazione di cellule epiteliali corticali timiche, con la massima concentrazione nella zona sub-capsulare. Il gradiente generato da CXCL12 guida i progenitori timici, derivanti dal circolo ematico, nella migrazione attraverso il microambiente timico, dove questi ultimi seguono un processo differenziativo che li porterà a maturità funzionale (Janas et al., 2010).

Lo sviluppo dei linfociti T nel timo post-natale può essere distinto in tre fasi principali: la linfopoiesi, la selezione mediata dal TCR e la maturazione funzionale; questi passaggi terminano con la generazione di cellule mature che saranno poi esportate in periferia.

La linfopoiesi include quattro stadi fenotipicamente e geneticamente distinti: il primo di questi è definito come CD4⁻CD8⁻CD25⁻CD44^{hi} (lineage doppio negativo stadio 1 DN1), questi progenitori contengono cellule con un potenziale differenziativo multi-lineage, ovvero hanno la capacità di generare linfociti T e B, cellule dendritiche e cellule NK, ma non cellule della linea mieloide.

Le cellule allo stadio successivo (DN2) sono CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44^{hi}, tali cellule hanno apparentemente perso la potenzialità di dare origine a cellule B e NK, ma, i linfociti T, possono ancora separarsi precocemente in due sotto-popolazioni con diversi recettori per l'antigene (TCR) quali cellule T con catene α/β o cellule T con catene γ/δ e portare inoltre alla formazione di cellule dendritiche. Lo stadio DN3 è caratterizzato dall'espressione dei marcatori: CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44^{lo}, queste cellule sono indirizzate esclusivamente verso la linea T, ma possono ancora formare sulla propria superficie sia recettori α/β che γ/δ . Allo stadio finale della linfopoiesi i linfociti sono caratterizzati dalla perdita dell'espressione del CD25, e soltanto le cellule T con catene α/β differenzieranno nelle due popolazioni principali di linfociti T coinvolte nell'immunità adattativa, quali i linfociti T helper (CD4⁺) e linfociti T citotossici (CD8⁺), infine una piccola percentuale di linfociti esprimerà un recettore di tipo γ/δ (Lind et al., 2001).

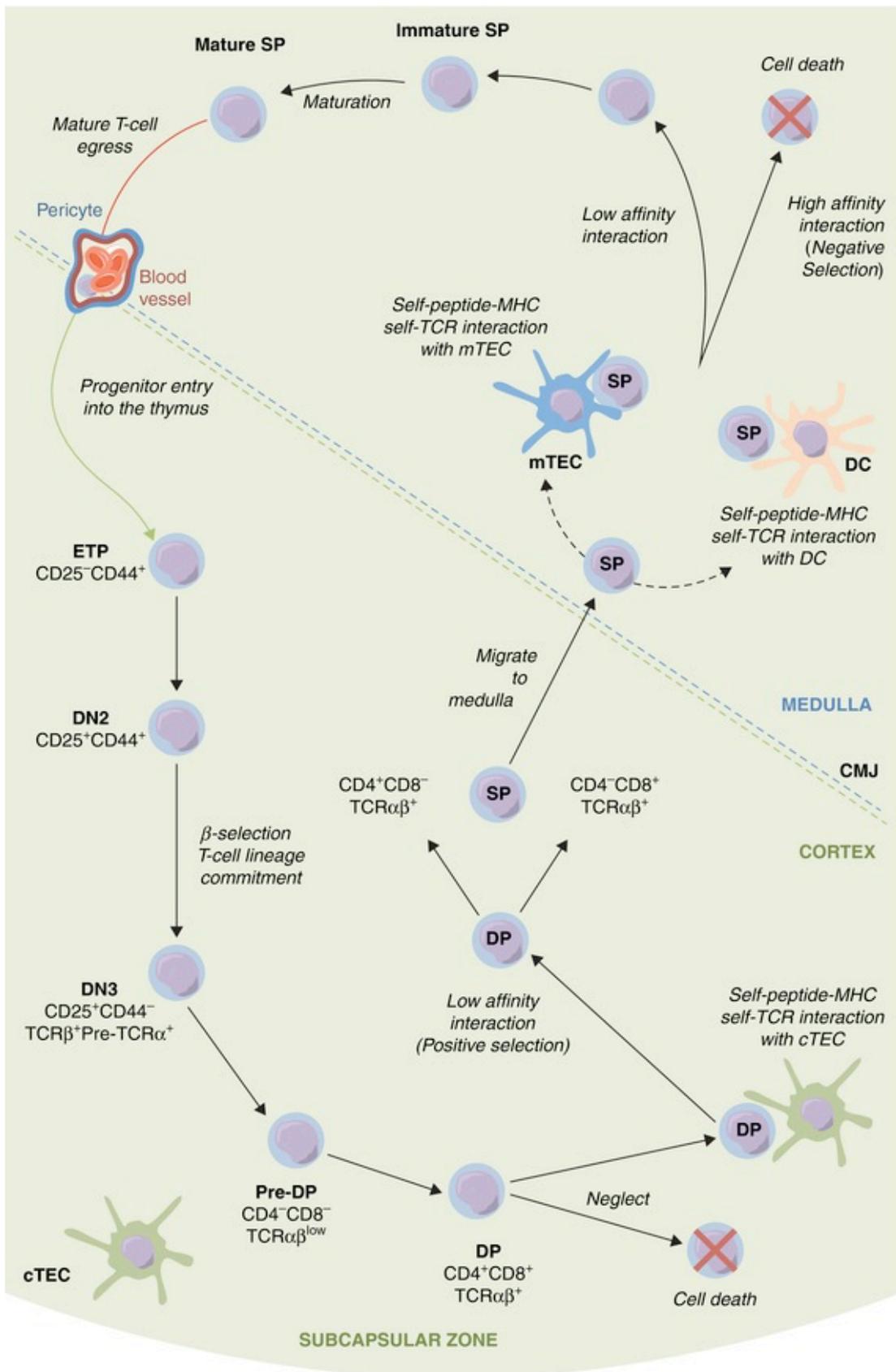


FIG.1: Maturazione dei linfociti T nel timo (James et al., 2018).

È stato osservato che soltanto un segnale emanato da un recettore assemblato correttamente sulla superficie cellulare dei linfociti T favorisce la sopravvivenza lungo il lineage differenziativo appropriato; per le cellule γ/δ è il complesso CD3, mentre per le cellule α/β è un complesso composto dal CD3 ϵ/γ , ϵ/δ , TCR β e da una catena invariante pre-TCR α (Starr et al., 2003).

Il recettore presente sulla maggior parte dei linfociti T è un etero-dimero formato da due catene polipeptidiche denominate α e β (o γ e δ più rare) legate covalentemente da un ponte disolfuro. La catena α è una glicoproteina acida mentre la catena β è una glicoproteina neutra o basica; sia la catena α che la β posseggono regioni variabili (V) e regioni costanti (C) unite da un segmento di giunzione (J), ma nel caso della catena β è presente un quarto segmento detto della diversità (D). Il riarrangiamento genico del TCR si verifica durante lo sviluppo delle cellule T nel timo. Nei geni della catena α un segmento genico V viene unito ad uno J attraverso la ricombinazione somatica del DNA; nel gene della catena β la ricombinazione unisce inizialmente un segmento genico D ad uno J, questi vengono poi congiunti ad un segmento genico V. Durante la ricombinazione vengono inseriti ulteriori nucleotidi non presenti nel filamento stampo della linea germinale nelle giunzioni tra i diversi segmenti delle catene α e β generando così un'ulteriore diversità nelle catene del TCR. Queste catene possiedono code citoplasmatiche estremamente corte e quindi prive di qualsiasi funzione di segnalazione; a tal proposito l'espressione del recettore per l'antigene sulla superficie della cellula T richiede l'associazione ad altre quattro proteine invarianti di membrana definite nell'insieme complesso CD3, individualmente denominate CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ e ζ .

Nella membrana plasmatica le proteine CD3 e la catena ζ si trovano in associazione stabile formando il complesso del recettore per l'antigene; avvenuto il riconoscimento con l'antigene da parte dell'etero-dimero α/β i domini citoplasmatici delle proteine CD3 e la catena ζ trasducono il segnale all'interno della cellula (Parham et al., 2009).

Infine, le sottopopolazioni delle cellule T mature sono rigidamente distinte in base all'espressione di altre due glicoproteine, CD4 e CD8, le quali funzionano come molecole accessorie facilitando le rispettive funzioni dei linfociti T helper e citotossici. Le funzioni di CD4 e CD8 sono intimamente connesse con il TCR e per tale motivo queste molecole sono denominate co-recettori (**FIG.2**).

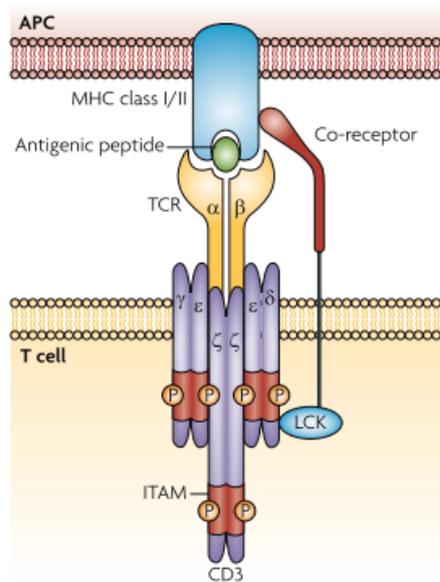


FIG.2: Struttura del complesso del recettore per l'antigene e dei co-recettori. Il recettore delle cellule T interagisce con il complesso peptide-MHC e i co-recettori stabilizzano questa interazione (Gascoigne, 2008).

Durante la maturazione delle cellule T i precursori ematopoietici raggiungono il timo allo stadio di DN (pro-T) e non esprimono né il TCR, né il CD3, poiché i geni delle catene γ , δ , β , α risultano silenti. Le cellule pro-T sono deficitarie dell'espressione delle molecole co-recettoriali, ed è proprio questa assenza, che le caratterizza come timociti DN; questi ultimi si localizzano nella corteccia sub-capsulare (MacDonald and Wilson, 1998).

Nello stadio successivo di sviluppo definito pre-T ha inizio il riarrangiamento e la trascrizione dei geni delle catene γ , δ , β del TCR. Le cellule che riarrangiano produttivamente le catene γ e δ maturano in linfociti $T\gamma\delta$, questi possono migrare poi in periferia, o intraprendere la linea differenziativa $T\alpha\beta$ che, nella fase precoce di timociti DN assembla una forma immatura del TCR, il pre-TCR o pT α in cui la catena β è associata alla forma invariante pre-T α .

La funzione del pre-TCR è fondamentale nello sviluppo dei linfociti T, esso infatti media la sopravvivenza delle cellule DN e contribuisce all'espansione proliferativa; inoltre tra le sue funzioni principali c'è quella di rendere le cellule che lo esprimono permissive al riarrangiamento della catena α del TCR, i segnali provenienti dai recettori dei linfociti DN fanno dunque iniziare la ricombinazione del locus di tale catena, mentre l'assenza di questi e l'incapacità a riarrangiare il TCR porterà a morte queste cellule. L'assemblaggio di pT α e CD3 porta alla proliferazione cellulare, passando attraverso l'arresto di un ulteriore riarrangiamento dei geni della catena α e l'espressione sia del CD4 che del CD8 giungendo

così allo stadio di timociti doppio positivi (DP); questi timociti esprimono anche il recettore per le chemochine CCR7 che li guida dalla zona corticale alla midollare. In particolare, il riarrangiamento della catena α del TCR e degli etero-dimeri $\alpha\beta$ si verificano nella popolazione DP subito prima o durante la migrazione dei timociti nella corticale midollare, quando l'espressione tardiva del gene RAG nello stadio pre-T promuove la ricombinazione del gene α , con la conseguente espressione della forma matura del complesso in superficie.

Il complesso del recettore per l'antigene è dunque una struttura di superficie che definisce la linea T dei linfociti, esso svolge due funzioni fondamentali: il riconoscimento dell'antigene e l'attivazione di segnali necessari per montare risposte adeguate alle aggressioni esterne e/o al differenziamento. Dopo la transizione allo stadio di cellule DP le interazioni linfo-stromali inducono proliferazione e assicurano che il repertorio di cellule T sia selezionato in modo che queste siano reattive contro gli agenti estranei e tolleranti verso gli autopeptidi. È stato dimostrato che questo accade sulla base dell'avidità d'interazione tra il TCR sulla superficie dei timociti e il complesso peptide self-MHC (complesso maggiore d'istocompatibilità) espresso dalle cellule stromali nella corteccia del timo in un processo definito selezione positiva mentre le cellule epiteliali della midolla mediano la selezione negativa delle cellule T (**FIG.3**).

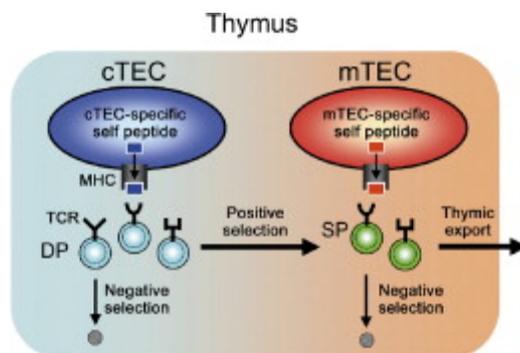


FIG.3: Rappresentazione schematica dei meccanismi di selezione positiva e negativa dei linfociti T mediata dalle cellule epiteliali della corteccia e della midolla (cTEC e mTEC rispettivamente) nel timo, interagenti con il complesso maggiore d'istocompatibilità di classe I e II (Nitta et al., 2008).

1.1 Maturazione e migrazione delle cellule T nei diversi compartimenti del timo

Le cellule epiteliali timiche della corteccia (cTEC) hanno un'attività di processing dell'antigene che risulta nella generazione di un repertorio unico di peptidi utili per la selezione positiva.

L'avidità d'interazione fra TCR e MHC-peptide seleziona i timociti corticali DP indirizzandoli verso morte o sopravvivenza. I timociti DP che ricevono segnali dal TCR dopo un'interazione debole con il ligando e un'aggregazione non estensiva sono indotti a sopravvivere e differenziare in timociti maturi (selezione positiva). Al contrario, timociti DP, che ricevono il segnale dopo interazioni ad alta affinità insieme a un'estesa aggregazione sono destinati a morire (selezione negativa o delezione clonale).

Le cellule pre-T che nella corteccia hanno superato la selezione positiva, tramite un segnale mediato da CCR7, si spostano nella medulla. Nella medulla l'incontro con un'elevata concentrazione di cellule dendritiche (DC_s), che presentano gli antigeni self per la selezione negativa, e con cellule epiteliali timiche midollari (mTEC), che esprimono promiscuamente molti antigeni tessuto specifici, minimizza le possibilità che cellule T auto-reattive (che riconoscono auto-peptidi) possano sfuggire alla selezione negativa prevenendo così fenomeni di autoimmunità; quindi tutte quelle cellule che nella medulla andranno incontro ad interazioni ad alta affinità con peptidi self saranno rimosse mediante apoptosi (Ziegler et al., 2008).

Il definitivo differenziamento dei timociti a singoli positivi CD4⁺ o CD8⁺ dipende dalla possibilità che l'interazione con l'auto-peptide avvenga tramite una proteina MHC di classe II o I. Nei cloni di cellule T, i co-recettori interagiscono con segmenti conservati delle molecole MHC (CD8 con MHCI e CD4 con MHCII) mentre il TCR α/β riconosce uno specifico peptide legato a un segmento polimorfico della stessa molecola MHC; questo determina il costituirsi di un complesso trimolecolare.

Durante la selezione positiva, i timociti differenziano in prima istanza in cellule intermedie CD4⁺CD8^{low}; poi, se incontrano una cellula stromale che espone un auto-peptide legato ad una molecola MHC di classe II, la perfetta aderenza della MHCII con il complesso TCR a livello della membrana, causa nel citoplasma una modificazione conformazionale a livello della coda del CD3, che viene a trovarsi in prossimità della proteina Lck legata al co-recettore CD4 e da questa fosforilata. Viene indotta così l'attivazione del fattore nucleare di trascrizione, GATA3, che promuove il differenziamento delle cellule in linfociti T CD4⁺.

Al contrario se le stesse cellule intermedie incontrano una molecola MHC di classe I, il legame tramite il co-recettore CD4 non avviene; in questo modo il segnale proveniente dal TCR non viene più trasdotto, GATA3 è inattivo, mentre viene accesa un'altra via di segnalazione mediata da IL-7, la quale silenzia l'espressione dei geni per il CD4 e favorisce quindi lo sviluppo di linfociti singolo-positivi CD8⁺ (**FIG.3**).

I timociti che completano questi stringenti eventi di selezione migreranno dal timo per colonizzare gli organi linfoidi periferici e adempiere la loro funzione come effettori nella risposta immunitaria.

2. LE CHEMOCHINE E I LORO RECETTORI

Il timo consiste di compartimenti anatomici dedicati al supporto delle diverse fasi di sviluppo delle cellule T; infatti il microambiente timico supporta la proliferazione e il differenziamento dei progenitori derivati dal midollo osseo. La progressione dei timociti immaturi doppi negativi (DN) da DN1 a DN4 è influenzata dalla loro localizzazione nell'architettura timica così come dall'espressione di specifici recettori di superficie.

I timociti DN1 e DN2 migrano dalla giunzione corticomidollare fino alla corteccia esterna evolvendosi allo stadio DN3 che si localizza principalmente nella regione sub-capsulare (SCZ). La beta selezione, che porta al riarrangiamento del TCR- β e all'assemblaggio del complesso del pre-TCR, inizia proprio durante lo stadio DN3 e termina nella fase DN4; il riarrangiamento della catena beta coincide con lo spostamento delle cellule DN4 dalla corteccia alla medulla. I timociti che esprimeranno un corretto pre-recettore per l'antigene iniziano la ricombinazione nel locus della catena α e proseguono poi la maturazione verso lo stadio di cellule doppio positive CD4⁺CD8⁺ e infine singolo positive CD4⁺ e CD8⁺.

La migrazione, il differenziamento e la selezione dei timociti sono orchestrate da molecole espresse dall'epitelio timico e dai timociti stessi, è stato osservato che la medulla esprime un elevato numero di chemochine, che con i propri recettori, sono coinvolte nel processo di migrazione e nel differenziamento dei timociti. In particolare è stato recentemente dimostrato che il fattore SDF-1/ CXCL12 (*stromal cell-derived factor*), espresso ad alti livelli nella corteccia, ed il suo recettore CXCR4 (*CXC chemokine receptor 4*), espresso dai timociti, hanno un ruolo cruciale nello sviluppo delle cellule T. Topi mancanti dell'espressione di CXCR4 o CXCL12 mostrano una migrazione difettiva delle cellule DN dalla regione sub-capsulare alla corteccia, così come nella transizione da cellule DN a DP (Halkias et al., 2013).

Crescenti evidenze suggeriscono che l'asse CXCR4/CXCL12 svolge un ruolo fisiologico fondamentale nello sviluppo dei tessuti, infatti è essenziale per la migrazione dei progenitori cellulari durante l'ematopoiesi embrionale e l'organogenesi, così come nell'omeostasi degli organi, nella vascolarizzazione e nella rigenerazione dei tessuti (Balkwill, 2004).

Il sistema delle chemochine rappresenta inoltre, il codice di comunicazione comune a tutti i tipi cellulari implicati nella risposta immunitaria affinché essa sia responsiva, efficiente, sicura e rapida, modulando la migrazione cellulare. Per assolvere questa funzione il codice chemochinico risulta essere ricco, versatile e finemente modulabile.

L'importanza che queste molecole ed i loro recettori rivestono, sta inoltre nel fatto che hanno un ruolo importante in diversi processi patologici quali: infiammazione, allergia, danno tissutale, infezioni, malattie cardiovascolari e tumori maligni, inoltre, orchestrano la circolazione leucocitaria in condizioni sia fisiologiche che patologiche. È ormai accertato che le chemochine hanno una funzione essenziale nel facilitare la comunicazione tra cellule cancerose e non (neoplastiche) all'interno del microambiente tumorale (TME), promuovendo processi quali l'angiogenesi e la metastatizzazione (Sun et al., 2010), probabilmente favorendo la sopravvivenza tumorale tramite differenti meccanismi. Questo le rende bersagli per la ricerca di agenti in grado di inibire sia la crescita tumorale che la metastatizzazione, perciò è importante comprenderne a pieno la biologia ed il ruolo sia in un contesto fisiologico che patologico.

Le chemochine, sono una classe di piccole (8-10 kDa) citochine infiammatorie o omeostatiche con una comune attività biologica nella stimolazione della migrazione di differenti tipi cellulari tra cui: linfociti, monociti, neutrofilo, cellule endoteliali, cellule mesenchimali staminali e cellule epiteliali tumorali (Laurence et al., 2006). La migrazione è indotta sia da fattori di crescita che da stimoli patologici, e la segnalazione delle chemochine, può coordinare il movimento cellulare durante l'infiammazione, il trasporto omeostatico delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule dendritiche; la migrazione direzionale delle cellule, che esprimono un appropriato recettore per le chemochine, avviene lungo il gradiente del ligando.

Il movimento direzionale, guidato da gradienti di sostanze chemo-attrattive e chemo-repulsive dette "chemotattiche", all'interno di un determinato microambiente extracellulare, è definito "chemiotassi".

Il termine chemochine, diminutivo di "citochine chemotattiche", fu infatti coniato nel 1992 per definire una grande famiglia di proteine con attività chemotattica; esse rappresentano

una grande famiglia di proteine strutturalmente omologhe in grado di stimolare il movimento dei leucociti direzionandone la migrazione dal circolo ai tessuti. Sono di piccole dimensioni, comprese tra i 67-127 residui amminoacidici, idrosolubili con la capacità di indurre la migrazione cellulare (Del Pozo et al., 1998).

La famiglia delle chemochine può essere distinta in quattro sottofamiglie in base alla posizione e al numero di residui di cisteina altamente conservati nella regione N-terminale: CXC, CC, XC, e CX3C (**FIG.4**). Le chemochine appartenenti alla famiglia CC (beta) hanno due residui di cisteina adiacenti; le CXC (alpha) contengono invece un singolo amminoacido non conservato (X) tra i residui di cisteina N-terminali; le chemochine XC (gamma) hanno perso il secondo residuo di cisteina, infine le CX3C (delta) contengono tre amminoacidi variabili tra i residui di cisteina (Rossi D. et al., 2000). I nomi che gli vengono attribuiti derivano dalla struttura delle chemochine stesse utilizzando la lettera L seguita da un numero per indicare i ligandi, mentre si utilizza la lettera R per contrassegnare i recettori per chemochine.

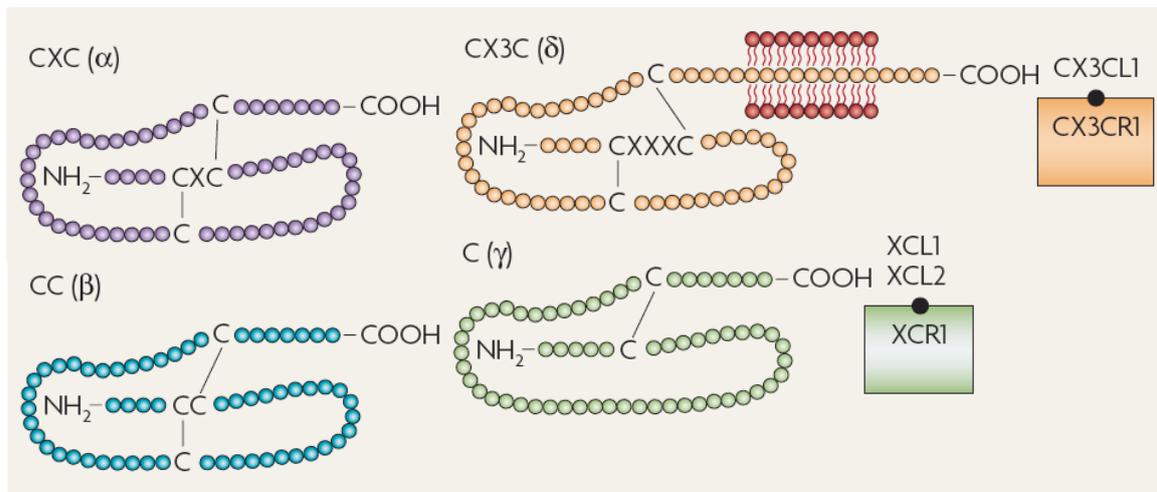


FIG.4: Classificazione delle quattro famiglie di chemochine e dei loro rispettivi recettori (W. Rostène et al., 2007).

La separazione su base strutturale ha tuttavia pochi riscontri a livello funzionale. Ciascuna chemochina, infatti, può esercitare la sua funzione chemotattica su cellule molto diverse, in vari organi, rendendo particolarmente difficile una classificazione su basi funzionali. Ad esempio nella famiglia CXC alcune chemochine contengono un motivo di tre amminoacidi ELR (glutammato, leucina, arginina) tra l’N-terminale e la prima cisteina, queste

chemochine (come ad esempio CXCL1-3 e CXCL5-8) si dimostrano chemoattraenti per i neutrofil.

Un modo alternativo per raggruppare le chemochine è sulla base del profilo d'espressione: costitutivo o inducibile. Le chemochine inducibili sono tipicamente espresse in seguito a stimoli infiammatori e, attraggono le cellule del sistema immunitario; tra queste troviamo le chemochine del gruppo ELR, CXC e anche CC, che attirano neutrofil ma anche monociti eosinofili e linfociti.

Le chemochine costitutivamente espresse, svolgono invece un ruolo chiave nei processi di organogenesi a livello embrionale e nella regolazione omeostatica di specifici microambienti o nicchie regolatorie (Laurence A. et al., 2006).

I recettori per chemochine appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), costituiti da una singola catena polipeptidica di circa 40 kDa e lunga 340-370 amminoacidi che forma sette eliche trans-membrana; tutti i recettori sono caratterizzati da un'estremità N-terminale localizzata nella regione esterna della superficie cellulare, tre loop extracellulari, tre loop intracellulari ed un'estremità carbossi-terminale sporgente nel citoplasma (**FIG.5**).

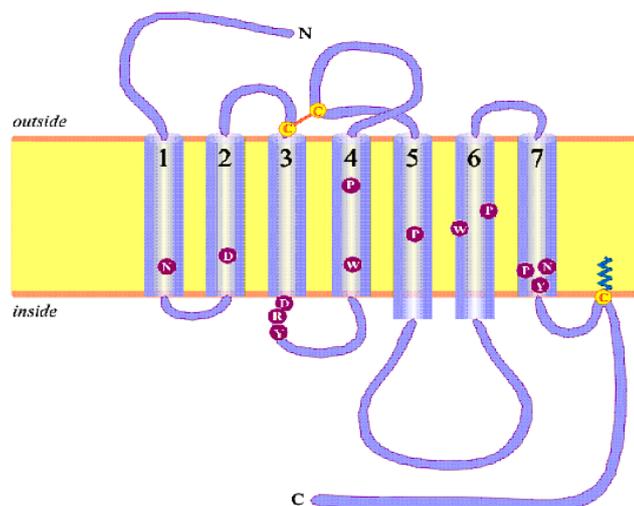


FIG.5: I recettori per le chemochine appartengono alla famiglia dei recettori a sette eliche trans-membrana.

Uno dei loop intracellulari del recettore si lega a proteine G eterotrimeriche che mediano, in seguito al legame del ligando con il recettore, l'attivazione di una cascata di eventi intracellulari (Sun et al., 2010).

Le proteine G etero-trimeriche sono composte da 3 sub-unità: $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$, sia la sub-unità $G\alpha$ che $G\beta$ sono covalentemente legate alle code di lipidi che ancorano le proteine alla membrana plasmatica. Nella conformazione inattiva o allo stadio basale, la sub-unità $G\alpha$, è legata ad una molecola di GDP (*guanine nucleotide diphosphate*). Una volta avvenuta l'attivazione del recettore, in seguito al legame con le chemochine, esso funge da fattore di scambio di nucleotidi guaninici e promuove il rilascio del GDP, in cambio del legame con il GTP (*guanine nucleotide triphosphate*), grazie ad una modificazione nella struttura terziaria della componente $G\alpha$. Questa sostituzione induce un ulteriore cambio conformazionale che spinge la sub-unità $G\alpha$ a distaccarsi dal dimero $\beta\gamma$, il quale, agisce come un'unità funzionale e non presenta differenze strutturali con il dimero all'interno della proteina G intatta. Entrambe le componenti attivate interagiscono con varie proteine effettrici attivando diverse vie di segnalazione che conducono all'incremento dei livelli di fosfatidilinositolo-3-fosfato (PIP3) e all'attivazione di proteine serin-chinasiche (PKB e Akt), delle chinasi MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e di PKC. È stato dimostrato che l'attivazione di queste chinasi è implicata nella regolazione di molteplici funzioni cellulari, che non riguardano soltanto la motilità cellulare, ma anche i processi di adesione, proliferazione e sopravvivenza cellulare.

I distinti ruoli delle vie di segnalazione che partono dai recettori GPCRs dipendono dalla sub-unità alpha a cui essi sono accoppiati, ne esistono infatti 4 famiglie $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$.

$G\alpha_s$ stimola l'adenilato ciclasi mentre la $G\alpha_i$ lo inibisce; $G\alpha_q$ agisce tramite la PLC β attivando la PKC a valle che favorisce il rilascio di calcio intracellulare; infine la $G\alpha_{12}$ tramite Rho-GEF favorisce l'attivazione a valle della piccola proteina G Rho-A (**FIG.6**). La durata della segnalazione del GPCR dipende dall'emivita della proteina $G\alpha$ nello stato in cui è legata al GTP. L'idrolisi del GTP, conduce all'inattivazione di questa sub-unità ed alla sua riassociazione con il dimero $G\beta/G\gamma$ che pone fine all'interazione con i diversi effettori (Cojoc et al., 2013).

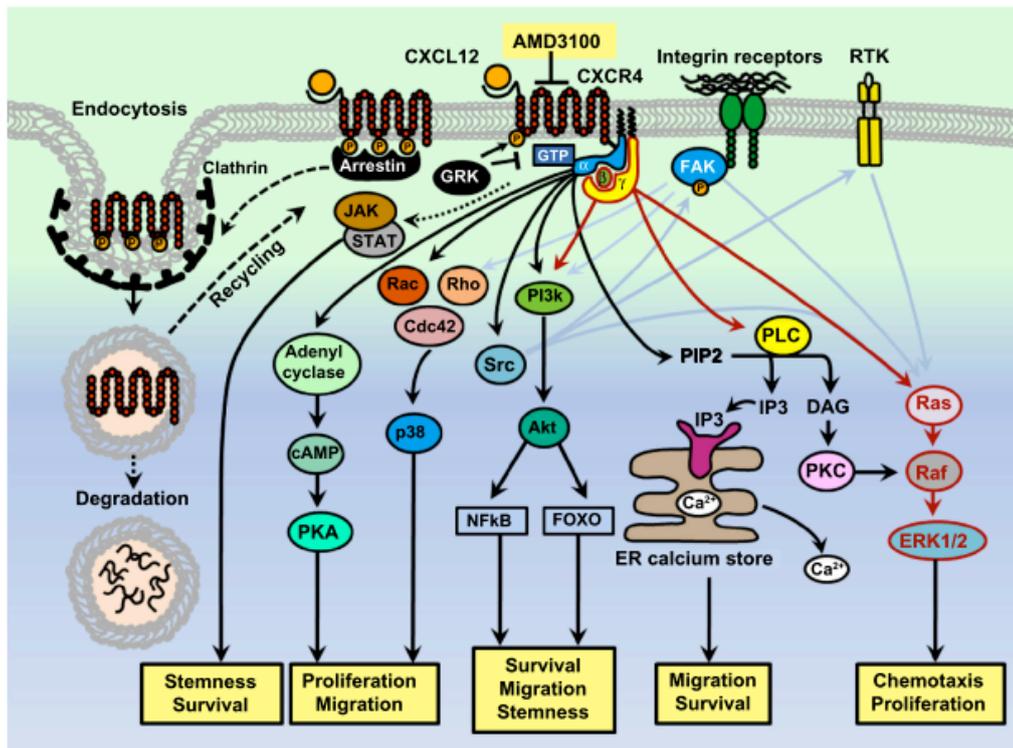


FIG.6: Il recettore chemochinico può segnalare attraverso diverse famiglie di proteine G α , risultando in distinte vie di segnalazione e distinti effetti biologici (Cojoc et al., 2013).

A complicare l'interazione tra le chemochine ed i loro recettori c'è l'abilità delle chemochine solubili di formare sia omodimeri che eterodimeri. È stato osservato che la dimerizzazione è in grado di modificare la funzione delle chemochine inibendola o favorendola.

I recettori per le chemochine, essendo sufficientemente simili in struttura a queste ultime, sono anch'essi in grado di eterodimerizzare con altri recettori causando importanti cambiamenti fenotipici, comprese marcate alterazioni nella farmacologia del recettore, cambiamenti nell'accoppiamento con le proteine G e nella segnalazione, nonché modificazioni nella regolazione e nel traffico cellulare del recettore (Kroeger et al., 2003).

Inusuale caratteristica delle chemochine è la loro promiscuità nei confronti di più recettori; sebbene chemochine della sotto famiglia CC leghino soltanto recettori CC, una singola chemochina CC è in grado di interagire con diversi recettori; allo stesso modo un singolo recettore per chemochine CC è in grado di legare più chemochine CC. Lo stesso si verifica nella famiglia CXC sebbene i recettori CC siano più promiscui rispetto ai recettori CXC. La ragione di questo fenomeno non è nota ma potrebbe essere correlata con la complessa regolazione dell'espressione dei recettori per chemochine (FIG.7).

mielopoiesi; inoltre sia CXCR4 che SDF-1 svolgono un ruolo prominente nella metastatizzazione delle cellule cancerose.

SDF-1 o CXCL12 (*Stromal-derived factor-1*) è una piccola chemochina di 8 kDa appartenente alla famiglia CXC, fu clonata per la prima volta da una linea di cellule stromali derivate dal midollo osseo e gli fu più tardi attribuito il ruolo di fattore stimolante la crescita delle cellule pre-B. Originariamente gli venne inoltre riconosciuta una funzione come potente chemoattrattore per cellule ematopoietiche mature ed immature, giocando un ruolo importante nel dirigere le cellule staminali ematopoietiche CD34⁺ al midollo osseo e, nel mediare la sopravvivenza e la proliferazione dei progenitori cellulari. Ad oggi è considerato un modulatore in molti processi fisiologici; infatti CXCL12 è una chemochina pleiotropica ampiamente espressa in differenti organi, quali cervello, polmoni, colon, cuore, reni e fegato; dove gioca un ruolo importante nell'infiammazione, nella risposta immunitaria, nella rigenerazione e nel riparo dei tessuti.

D'altra parte CXCR4 è un recettore a sette eliche trans-membrana altamente conservato; fu clonato per la prima volta a partire da leucociti prelevati da pazienti affetti da leucemia linfocitica acuta (Busillo and Benovic, 2006). CXCR4 è espresso in un'ampia gamma di tessuti, incluso il sistema immunitario, dove media la migrazione dei leucociti e dei progenitori ematopoietici in risposta al gradiente generato da CXCL12, agendo così in un elevato numero di processi fisiologici. In particolare questo recettore nel sistema immunitario è altamente espresso da: monociti, cellule B, cellule T native nel sangue e dai progenitori ematopoietici precoci del midollo osseo. CXCR4 è anche espresso sulla superficie di cellule diverse da quelle immunitarie, tra cui: cellule staminali endoteliali, neurali, scheletriche, epiteliali ed embrionali, in più si trova anche sulle cellule satelliti del tessuto muscolare e su quelle pigmentate della retina (Cojoc et al., 2013).

La regione del promotore di CXCR4 contiene diverse sequenze consenso regolatrici, tuttavia la trascrizione basale è controllata principalmente dall'azione opposta di due principali fattori: NRF-1 (*Nuclear respiratory factor 1*) che agisce come regolatore positivo della trascrizione del recettore, e il fattore YY1 (*Ying Yang 1*) che influenza negativamente il promotore di CXCR4 (Busillo and Benovic, 2006).

Nella maggior parte dei tessuti normali, l'espressione di questo recettore, risulta essere bassa o assente al contrario essa è regolata positivamente nelle cellule cancerose; la sua over-espressione è stata di fatto dimostrata in oltre 23 tumori umani tra cui il cancro al seno, alle ovaie, il melanoma e il cancro alla prostata (Sun et al., 2010). Diversi fattori sono in grado di aumentare l'espressione di CXCR4 durante la progressione tumorale, tra

i più noti induttori ritroviamo il VEGF (*vascular endothelial growth factor*), è stato inoltre dimostrato che il fattore trascrizionale HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1 α*), sensibile alle concentrazioni d'ossigeno nei tessuti, agisce a monte inducendo VEGF e di conseguenza aumentando l'espressione di CXCR4 (Sun et al., 2010). Così nelle regioni ipossiche dei tumori in espansione, i livelli dei recettori per chemochine sono aumentati in modo da facilitare la sopravvivenza e "l'escape" dalla massa tumorale primaria portando alla proliferazione, alla resistenza, all'apoptosi e all'invasione locale (Sun et al., 2010).

In generale nei tumori solidi l'asse CXCR4/CXCL12 promuove la sopravvivenza cellulare, la proliferazione, l'angiogenesi e la metastatizzazione. Ad esempio, studi incentrati sul cancro alla prostata hanno dimostrato che neutralizzando l'interazione CXCL12/CXCR4 sono inibite la crescita e la vascolarizzazione del tumore (Sun et al., 2010), confermando quindi il ruolo di questo recettore nella proliferazione e nell'angiogenesi. Nel cancro al seno, invece, la segnalazione di CXCR4 in risposta al suo ligando, media la polimerizzazione del citoscheletro d'actina e la formazione di pseudopodi, inducendo di conseguenza risposte chemotattiche ed invasive in altri tessuti; le cellule neoplastiche possono infatti utilizzare i loro recettori per migrare in quei tessuti dove le chemochine (come CXCL12) sono normalmente espresse e che sono comuni siti di metastatizzazione come il midollo osseo e i linfonodi (**FIG.8**) (Sun et al., 2010).

In contrasto con i tumori solidi, che invadono il midollo osseo, la maggior parte delle neoplasie ematopoietiche ha origine proprio nel midollo. In questo particolare microambiente le cellule ematopoietiche maligne sono in stretto contatto con le cellule stromali da cui ricevono segnali di crescita e sopravvivenza tramite fattori legati sulla loro superficie o secreti (Sun et al., 2010).

La dipendenza dall'asse CXCR4/CXCL12 è stata dimostrata, ad esempio, nel mieloma multiplo e nella leucemia acuta (Mirandola et al., 2013; Scupoli et al., 2008).

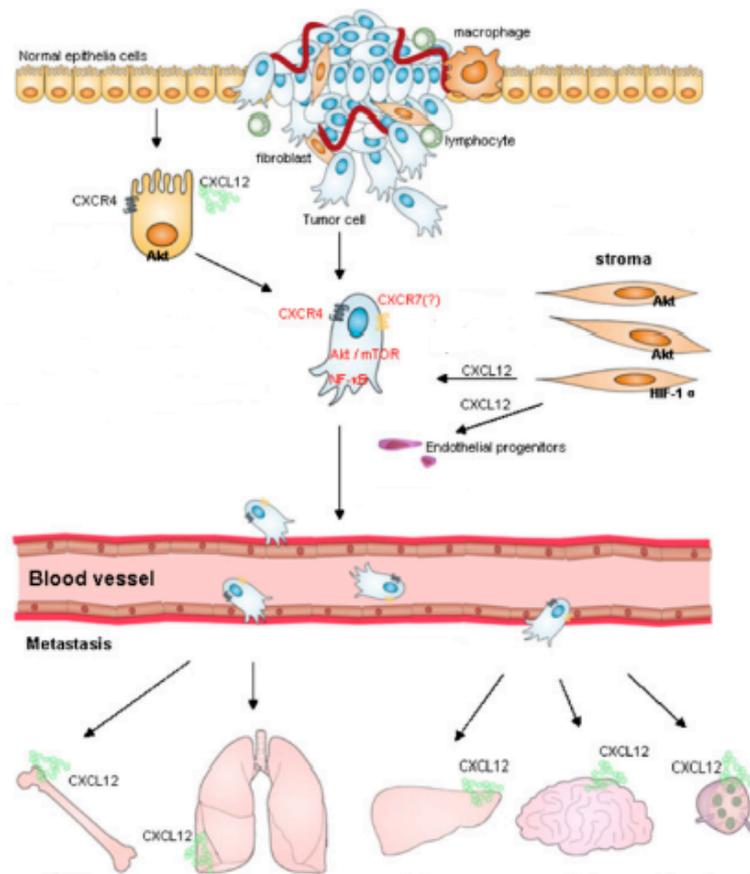


FIG.8: La comunicazione tra le cellule stromali e le cellule tumorali può regolare l'espressione di CXCR4, e tramite il gradiente chemoattrattivo indotto da CXCL12 le cellule tumorali positive a CXCR4 metastatizzano (Sun et al., 2010).

La formazione di metastasi richiede diversi passaggi distinti, tra cui il raggiungimento dei vasi sanguigni da parte di cellule tumorali, la sopravvivenza nella circolazione, il movimento verso un organo secondario, l'adesione e la proliferazione delle cellule tumorali nell'organo bersaglio.

Studi in vitro hanno dimostrato che l'asse CXCR4/SDF-1 α , attivando vie metaboliche diverse, è potenzialmente in grado di giocare un ruolo chiave in molti di questi processi. (Sun et al., 2010).

3. CXCR4 NEL DIFFERENZIAMENTO INTRATIMICO

La chemochina CXCL12 dirige i progenitori ematopoietici all'interno del midollo osseo; il suo recettore CXCR4, è infatti, espresso sulla superficie delle cellule B primitive, e durante la maturazione, la sua espressione cambia indirizzando le cellule B in diversi siti di differenziamento nel midollo osseo, dove, queste cellule, completano la propria maturazione (Laurence et al., 2006). Sistema analogo di controllo è stato osservato per lo sviluppo delle cellule T nel timo; è stato infatti dimostrato un ruolo non ridondante dell'asse CXCR4/CXCL12 nelle vie di segnalazione dei progenitori provenienti dal sangue; essi migrano specificamente in direzione della corteccia timica dove, incontrano i segnali differenziativi e proliferativi richiesti per un appropriato sviluppo (Plotkin et al., 2003).

Le chemochine, sono quindi implicate nella migrazione direzionale dei linfociti che si verifica durante i vari stadi differenziativi nel timo; sebbene una grande varietà di recettori per chemochine risultino espressi durante uno o più stadi maturativi, CXCR4 è emerso come il più abbondante ed ubiquitario. Il suo mRNA è presente ad elevati livelli negli stadi CD25⁺ (DN2 e DN3), cellule attivamente migranti attraverso la corteccia; quantità più basse del recettore si sono riscontrate durante lo stadio DN1 e pre-DP, dove, i livelli medi di espressione risultano paragonabili a quelli di altri geni, infine CXCR4 è completamente assente nei timociti SP.

Nella progressione maturativa delle cellule doppio negative, CXCR4 gioca un ruolo importante in combinazione con il CCR7, come dimostrato in topi CXCR4 e CCR7 deficienti (Ara et al., 2003), suggerendo che la differenziazione ottimale dei timociti DN richiede una migrazione verso la corteccia, chemochina dipendente (Nitta et al., 2008).

Insieme, queste osservazioni, indicano che i progenitori intra-timici che sintetizzano CXCR4 sono potenzialmente in grado di rispondere al suo ligando (Plotkin et al., 2003).

CXCL12/SDF-1 è espresso da una sottopopolazione di cellule corticali epiteliali, con concentrazioni maggiori nelle regioni più esterne della corteccia, ed in particolare nella zona sub capsulare (SCZ), mentre è totalmente irrilevabile nella medulla. Quindi, il ligando di CXCR4, è espresso nel timo in modo da guidare i progenitori nella corteccia, lontano dalla medulla; di fatto tutte le popolazioni di timociti rispondono proporzionalmente ai cambi di concentrazione di CXCL12 (Plotkin et al., 2003).

È appunto l'espressione differenziale di questa chemochina a guidare i progenitori timici derivanti dal circolo ematico: questi giungono nel timo a livello della giunzione

corticomidollare e, da qui, in risposta al gradiente di CXCL12, migrano all'interno del microambiente timico seguendo un processo di differenziamento che li porterà alla maturità funzionale (Janas et al., 2010).

Vista l'espressione di CXCR4 sui precursori delle cellule T, è stato proposto e dimostrato che questo recettore ha un ruolo nelle fasi più precoci del processo di maturazione cellulare che avviene nel timo, in particolare è coinvolto nel meccanismo della selezione β (Janas et al., 2010). Il checkpoint nella selezione β , che porta al riarrangiamento produttivo del gene del TCR β e l'assemblaggio del complesso del pre-TCR, inizia allo stadio di DN3 e si completa allo stadio DN4. Questa selezione β coincide con il movimento delle cellule DN4 dalla cortex in direzione della medulla. Il complesso del pre-TCR è in grado di trasdurre segnali in modo ligando-indipendente, permettendo sopravvivenza e proliferazione dei timociti che lo esprimono. I timociti che progrediscono con successo negli stadi maturativi inizieranno a esprimere CD4 e CD8 (DP), e saranno sottoposti ad ulteriori processi maturativi differenziandosi in SP CD4⁺ e SP CD8⁺.

La selezione β avviene a livello della SCZ, dove si ha la più alta concentrazione di SDF1 α . La richiesta di CXCR4 per il processo di selezione è stata dimostrata in modelli sperimentali di topi knockout per il gene codificante questo recettore: nei topi veniva riscontrata atrofia timica, un numero ridotto di cellule DP ed un accumulo di timociti DN3. Analisi istologiche mostravano un incremento nella proporzione di cellule DN2 e DN3 nella corteccia timica e inoltre una riduzione di queste ultime a livello della zona sub-capsulare (Plotkin et al., 2003), dove normalmente avviene la selezione β . Evidenze recenti suggeriscono, inoltre, che CXCR4 e SDF1 α contribuiscono direttamente all'onda proliferativa che segue la selezione β , sopprimendo l'apoptosi. In particolare CXCR4 promuove l'espressione di Bcl2A1, un membro della famiglia di Bcl-2 che inibisce la via apoptotica iniziata dalla caspasi 3 (Janas et al. 2010). Già in precedenza, era stato dimostrato che Bcl2A1 è un target del fattore di trascrizione NF- κ B, il quale è attivato sotto la stimolazione del pre-TCR (Mandal et al., 2005). Da questi presupposti partono gli studi che delineano ancora meglio il ruolo di CXCR4 nella selezione β . Esso agirebbe come recettore co-stimolatorio del pre-TCR (Tramont et al., 2010). È stato dimostrato che sotto l'influenza di SDF1 α , CXCR4 e il pre-TCR si ridistribuiscono sulla membrana plasmatica e muovono l'uno verso l'altro promuovendo la loro co-localizzazione (Kumar et al., 2006). Si ha quindi un'interazione fisica tra i due recettori tramite un meccanismo che coinvolge la riorganizzazione citoscheletrica e l'attività della PI3 chinasi (PI3K) (Kumar et al., 2006). L'associazione di CXCR4 con il TCR porta alla costitutiva

fosforilazione del complesso TCR-ZAP70 che, a sua volta, determina una più robusta attivazione della proteina G monomerica Ras e di conseguenza una prolungata attività della chinasi ERK in risposta a SDF1 α . Infine la prolungata azione di ERK aumenta l'attività trascrizionale del fattore AP-1 che media l'espressione di citochine quali IL-10 e IL-2 coinvolte nella sopravvivenza, proliferazione cellulare, nel differenziamento e nell'esclusione allelica (**FIG.9**) (Kumar et al., 2006).

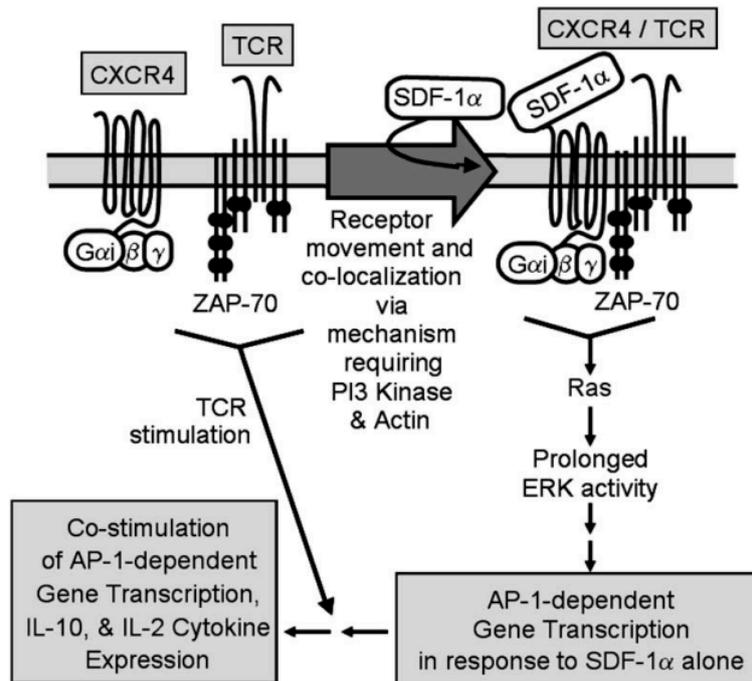


FIG.9: Il legame di SDF-1 a CXCR4 induce la sua associazione con il TCR (Kumar et al., 2006).

La beta selezione, la sopravvivenza e la proliferazione cellulare sono processi dipendenti oltre che dal pre-TCR anche dai geni Notch; infatti questi recettori sono espressi sui timociti, dove, la via di segnalazione di questo recettore, induce l'espressione del pT α e coopera con il pre-TCR per favorire il differenziamento delle cellule T fino allo stadio di timociti DP.

In conclusione il pre-TCR, Notch e CXCR4 possono essere considerati essenziali per iniziare una rete di segnalazione che condurrà allo sviluppo delle cellule T.

L'assemblaggio del pre-TCR innesca le vie di segnalazione di PI3K e MAPK. La fosforilazione della catena ζ e la tirosina chinasi ZAP70 conducono alla fosforilazione della molecola adattatrice ShcA che attivata, successivamente si complessa con Grb2, Ras e SOS per dare inizio alla via Ras/MAPK. Il segnale PI3K indotto dal pre-TCR è mediato

dall'isoforma p110 δ della classe IA. Anche il legame della chemochina SDF1 al suo recettore CXCR4 avvia le cascate di segnalazione che partono dalle MAPK e PI3K. L'adattatore ShcA viene poi direttamente fosforilato da CXCR4, che con l'attivazione del preTCR, induce una sostenuta risposta da parte delle MAPK. Insieme a Notch, il preTCR e CXCR4 danno inizio ai cambiamenti cellulari che sono richiesti per il continuo differenziamento delle cellule T (Janas and Tuner, 2010) (**FIG.10**).

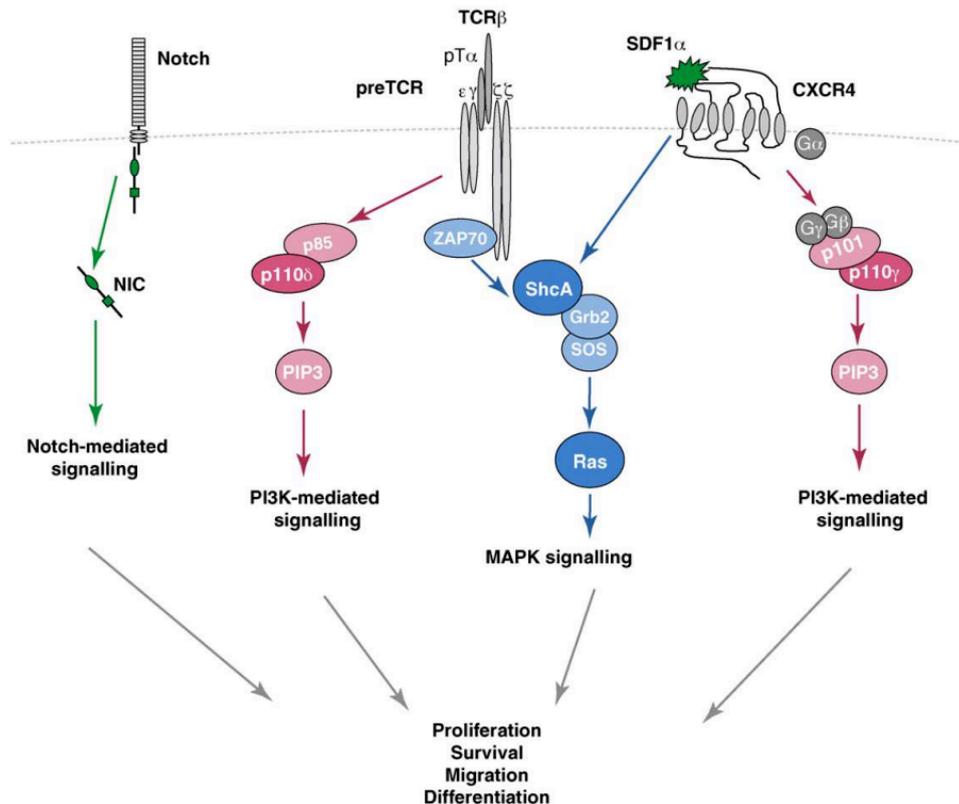


FIG.10: Interazione tra le vie di segnalazione del preTCR, CXCR4 e Notch1 richiesta per la selezione β e per il continuo differenziamento delle cellule T (Janas and Tuner, 2010).

Le informazioni riguardanti la correlazione esistente tra le vie di segnalazione di CXCR4 e Notch sono limitate e in letteratura sono riportati pareri discordanti. In un recente progetto di ricerca, condotto su cellule staminali mesenchimali (MCS) isolate dal midollo osseo di topo, si è studiata la capacità di queste cellule di differenziare in osteoblasti. Tramite il trattamento con inibitori delle gamma secretasi (GSI), è stata inibita l'attivazione di tutti i recettori Notch (Notch1,2, 3, e 4).

A tale inibizione corrispondeva il blocco della proliferazione delle cellule MSC ed il loro differenziamento in osteoblasti.

Inoltre, nelle cellule trattate con GSI, si osservava un aumento dell'espressione di CXCR4 e una maggiore presenza del recettore sulla superficie cellulare.

L'asse SDF-1/CXCR4 è inoltre una delle principali vie coinvolte nella migrazione delle cellule MSC nei siti di infiammazione; inibendo l'espressione del CXCR4, Notch influenzerebbe negativamente la mobilitazione delle MSC (Xie et al., 2013).

Al contrario in un altro lavoro, viene ipotizzato e successivamente dimostrato, che gli effetti della via di segnalazione di Notch nel mieloma multiplo, tra cui resistenza all'apoptosi e attività osteolitica, sono mediati dall'asse CXCR4/CXCL12 (Mirandola et al., 2013). In particolare nelle cellule di mieloma multiplo trattate con GSI si osserva una down-regolazione dei livelli di CXCR4 e SDF1 α , che sono direttamente correlati all'aumento di mortalità nella popolazione tumorale (Mirandola et al., 2013). Inoltre è stato dimostrato che, bloccando la segnalazione di Notch1 in vivo, si ha una significativa diminuzione dell'infiltrazione delle cellule di mieloma umano nel midollo osseo di topo in uno xenotrapianto (Mirandola et al., 2013).

È stato inoltre osservato che l'asse CXCL12/CXCR4 gioca anche un ruolo importante nella patogenesi della leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) (Scupoli et al., 2008).

La T-ALL risulta dalla proliferazione clonale di precursori linfoidi T e origina nel timo (Uckun et al, 1998). Sebbene nella minoranza dei casi le cellule T-ALL rimangano confinate nel timo, nella maggior parte dei casi le cellule leucemiche migrano nel midollo osseo (Scupoli et al., 2008). All'interno del microambiente tumorale, l'adesione cellulare e il rilascio di citochine ha un ruolo cruciale nella regolazione della crescita e della sopravvivenza delle cellule leucemiche. In particolare, è stato dimostrato che il gene dell'interleuchina-8 (IL-8) è altamente espresso nelle cellule di T-ALL refrattarie alla chemioterapia, inducendo angiogenesi e contribuendo direttamente alla progressione del tumore (Scupoli et al., 2008). E' proprio il legame di CXCL12 al suo recettore CXCR4, che regola positivamente l'espressione di IL-8, attivando le vie di segnalazione di NF- κ B e JNK/AP-1 nelle cellule cancerose (Scupoli et al., 2008).

Recentemente è stato scoperto un nuovo recettore per il CXCL12 conosciuto comunemente come CXCR7 o ACKR3 (*atypical chemokine receptor 3*), altamente espresso nel midollo osseo di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (Melo et al., 2014), in confronto a cellule mieloidi o normali cellule ematopoietiche. CXCR7 contribuisce alla migrazione delle cellule T leucemiche CXCR4⁺, probabilmente sequestrando l'eccesso di CXCL12 che potrebbe desensibilizzare il recettore, e bloccare la migrazione. È stato inoltre ipotizzato che l'eterodimero CXCR7/CXCR4 è in grado di potenziare la via di segnalazione del

CXCL12, inducendo meccanismi molecolari diversi rispetto a quelli indotti dal solo CXCR4. Questi eventi potrebbero contribuire alla persistenza della leucemia favorendo il reclutamento di cellule “iniziatrici” nel midollo osseo in quelle nicchie precedentemente occupate da normali cellule staminali ematopoietiche (Melo et al., 2014).

4. LA FAMIGLIA DELLE ARRESTINE ED IL LORO RUOLO NELL'INTERNALIZZAZIONE DI CXCR4

Negli ultimi anni sono stati identificati adattatori multifunzionali noti come arrestine, esse agiscono in numerose vie di segnalazione quali: la via di Hedgehog, Wingless, Notch e TGF β . La famiglia delle arrestine codifica per molecole che desensibilizzano o spengono il segnale canonico dei GPCR. Una volta avvenuto il legame con il ligando, i recettori GPCR vanno incontro ad un cambiamento conformazionale che permette loro di essere riconosciuti da una famiglia di chinasi, GRK_s, che fosforilano i recettori all'estremità C-terminale. Questa fosforilazione, in siti multipli sulla superficie interna del recettore, potenzia il legame delle arrestine, e crea un ingombro sterico che impedisce l'ulteriore attività delle proteine G e desensibilizza il recettore. Inoltre, le arrestine mediano l'endocitosi, clatrina-dipendente, soprattutto nei mammiferi, modulando fisiologicamente il riciclaggio o la degradazione del recettore.

Ci sono 4 membri della famiglia delle arrestine: Visual arrestin (arrestina1) localizzata nei coni e nei bastoncelli della retina mentre la X-Arrestin (arrestina4) si trova esclusivamente nei coni della retina. Le β -arrestine 1 e 2 (arrestina 2 e 3, rispettivamente) sono ubiquitariamente distribuite. Queste proteine sono strettamente correlate, hanno il 70% di identità nella sequenza e sono altamente conservate tra le specie (Kovacs et al., 2009). Tramite un'analisi filogenetica, negli ultimi anni sono state scoperte altre proteine che in aggiunta alle altre arrestine vanno ad ampliare la famiglia, cioè: le α arrestine/ARRDC_s (Puca et al., 2013). Il numero di recettori a 7 eliche trans membrana regolati attraverso le β -arrestine, sta crescendo rapidamente: ad esempio i recettori per chemochine subiscono una rapida internalizzazione agonista-indotta tramite un meccanismo che coinvolge la fosforilazione mediata del recettore della chinasi GRK e il legame della β -arrestina, inducendo l'internalizzazione tramite vescicole rivestite di clatrina. In questo processo è possibile un diretto coinvolgimento di AP2, richiesta per una sottopopolazione di chemochine; AP2 è una componente centrale delle vescicole rivestite di clatrina sulla

membrana plasmatica, è una proteina eterotetramerica che comprende le subunità $\beta 2$, α , σ e $\mu 2$. E' noto che AP2 interagisce con la β -arrestina per mediare l'endocitosi dei recettori GPCR, in particolare per CXCR4 è richiesta una complessa interazione recettore/ β -arrestina/AP2. In confronto ad altre chemochine CXCR4 viene principalmente indirizzato alla via degradativa e in particolare alla degradazione lisosomiale, una volta avvenuto il legame con CXCL12, CXCR4 in prossimità della membrana plasmatica viene ubiquitinato su residui di Lisina all'estremità C-terminale dalla ubiquitina E3 ligasi AIP4, viene internalizzato in endosomi precoci tramite un complesso costituito da AIP4, β -arrestina1, ESCRT e Vps4. Successivamente viene smistato nei lisosomi dove avviene la degradazione (FIG.11).

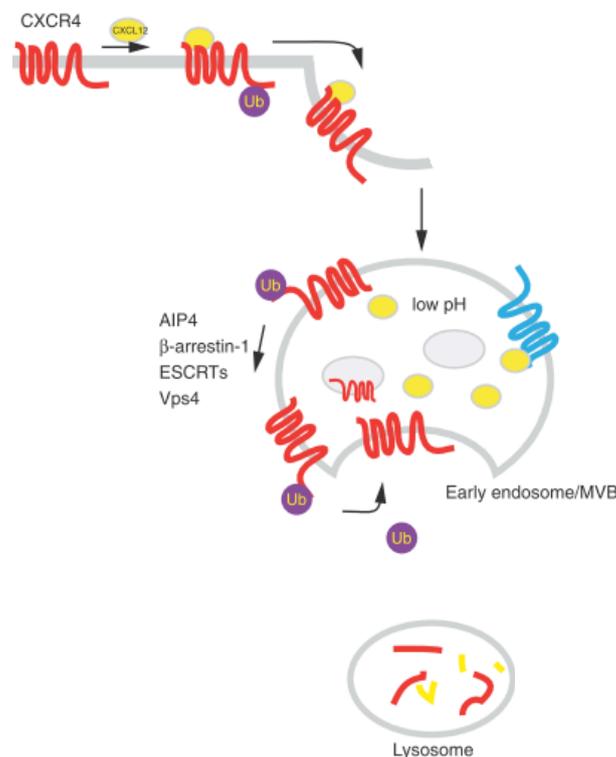


FIG.11: Via di degradazione e internalizzazione di CXCR4 (Marchese et al; 2013).

La β -arrestina1 funge da adattatore per molti recettori accoppiati a proteine G, soprattutto nella via di segnalazione delle proteine chinasi (MAP chinasi). La fosforilazione della β -arrestina1 nella serina 412 (Ser-412) può intaccare l'attività di questa proteina e così l'internalizzazione dei recettori beta adrenergici. La fosforilazione della β -arrestina1 nella serina 412 ne regola la funzione, in particolare è stato dimostrato che la fosforilazione in

questa serina indotta dall'insulina porta alla desensibilizzazione della via di segnale delle MAP chinasi; inoltre l'aumento della fosforilazione della β -arrestina1 nella Ser-412 ligando dipendente porta alla desensibilizzazione del segnale delle ERK. Pertanto, la defosforilazione mediata dal ligando della Ser-412 gioca un ruolo fondamentale nella segnalazione ERK mediata dalle proteine G, la β -arrestina1 ha una sequenza consenso ERK attorno alla Ser-412 ed ERK è stata identificata come la chinasi responsabile della fosforilazione di questo amminoacido (Hupfeld et al., 2005).

5. LA FAMIGLIA DEI GENI NOTCH

Nel 1917 il genetista Thomas Hunt Morgan e i suoi colleghi descrissero delle tacche (per l'appunto in inglese "notches") ai margini delle ali della *Drosophila melanogaster*, il moscerino della frutta. Solo però verso la metà degli anni 80, quando fu possibile clonare il gene Notch (**FIG.1**) (Kidd et al., 1986; Wharton et al., 1985), si giunse alla conclusione che il fenotipo osservato in passato, derivava da una parziale perdita di funzione del gene (aplo-insufficienza).

Queste mutazioni, causavano un fenotipo "neurogenico", nel quale cellule destinate a diventare epidermide davano invece origine ad un tessuto neurale. Da questi ed altri studi condotti negli anni, divenne evidente che Notch era in grado di agire a differenti stadi di sviluppo, giocando un ruolo critico nella determinazione del destino cellulare sia durante lo sviluppo embrionale che nell'omeostasi dei tessuti adulti; la via di segnale di Notch ha un importante ruolo nel differenziamento, nella proliferazione e nell'apoptosi ed è il principale meccanismo con cui differenti tipi cellulari vengono generati a partire da precursori equivalenti (Kovall and Hendrickson, 2004).

Questo recettore partecipa attivamente allo sviluppo delle cellule T e all'emopoiesi e ricopre un ruolo di primo piano nella regolazione funzionale delle cellule linfoidi periferiche influenzando così la risposta immunitaria (Radtke et al., 2010).

L'attivazione della cascata di Notch regola il processo di inibizione/specificazione laterale, limitando il numero di cellule che acquisiscono un particolare destino; fa sì che un tipo cellulare possa regolare la scelta differenziativa di un altro tipo cellulare, conducendo alla repressione trascrizionale di geni specifici per un determinato gruppo di cellule; infine agisce in modo che alcune cellule progenitrici mantengano la loro pluripotenza.

La famiglia dei geni Notch è evolutivamente conservata, esiste una corrispondenza diretta tra mammiferi, *Drosophila M.* e *C. Elegans* sia per quanto riguarda i recettori che per i

ligandi. Tuttavia il numero di paraloghi differisce tra le varie specie: ci sono quattro geni Notch nei vertebrati (NOTCH 1, 2, 3, 4) altamente correlati con i due geni in *C. Elegans* (LIN-12 e GLP-1), e con il singolo gene Notch in *Drosophila melanogaster*.

Lo stesso vale anche per i ligandi della segnalazione di Notch, che sono molteplici: nei vertebrati ci sono cinque diversi ligandi: Delta-like 1, 3, 4 e Jagged1 e 2; l'omologo dei Delta-like in *Drosophila* è Delta, mentre in *C. elegans* sono presenti Lag-2 e Apx-1. Jagged è il paralogo di Serrate in *Drosophila*.

In *D. melanogaster* Notch è essenziale per la specificazione di molti differenti destini cellulari, ad esempio durante l'oogenesi, la neurogenesi, la miogenesi, e per lo sviluppo delle ali e dell'occhio. Nei mammiferi la presenza di geni codificanti diversi recettori e ligandi, sembrerebbe riflettere un ampliamento delle funzioni di Notch, anche ad altri eventi di differenziamento o selezione. In alcuni casi i diversi ruoli dei recettori possono essere dettati da un'espressione differenziale nei tessuti o da quantità variabili di recettori e ligandi. Ad esempio l'espressione di Notch-4 è ristretta alle cellule endoteliali e sebbene Notch1,3 e 2 siano ampiamente espressi nel sistema linfoide, essi sono preferenzialmente attivi i primi nel timo e Notch2 nella milza. L'intervallo temporale di espressione dei diversi recettori e ligandi, potrebbe favorire la presenza di funzioni distinte nello stesso tessuto.

Le funzioni di Notch e delle altre molecole che mediano la trasduzione del segnale sono altamente conservate nei diversi organismi; questo si riflette nell'alto grado di omologia strutturale delle proteine codificate dai geni della via di segnale (Milner e Bigas, 1999).

5.1 Struttura dei recettori Notch e dei loro ligandi

I geni Notch codificano per un caratteristico tipo di recettore a singola elica transmembrana di 300-kD; questa proteina subisce un particolare tipo di processamento: i recettori sono infatti sintetizzati come singoli polipeptidi precursori che vengono processati proteoliticamente in una forma matura etero-dimerica; durante la maturazione, il precursore di Notch va incontro a modificazioni post-traduzionali nell'apparato di Golgi. Tramite una convertasi Furina-simile viene tagliato nel sito S1 (HD di eterodimerizzazione), generando un recettore etero-dimerico; questo è costituito da una sub-unità extracellulare (N-terminale), legata non covalentemente ad una seconda sub-unità (C-terminale), contenente il dominio di eterodimerizzazione, il dominio trans-

membrana ed infine la regione citoplasmatica del recettore (**FIG.12**) (Blaumueller et al., 1997).

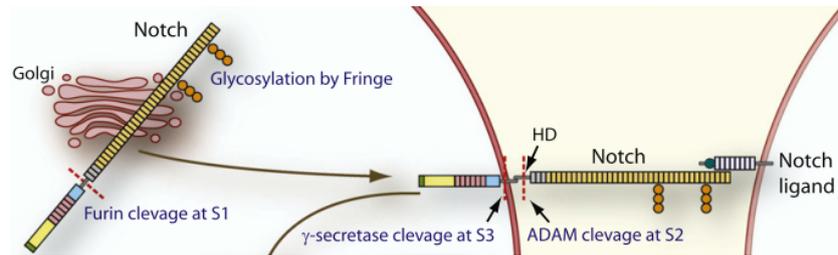


FIG.12: Il precursore di Notch va incontro a modificazioni post-traduzionali nell' apparato di Golgi dove ad opera di una convertasi Furina-simile viene tagliato nel sito S1 generando il recettore etero-dimerico finale assemblato sulla superficie cellulare (Radtke et al., 2010).

La regione extracellulare del recettore, formata da circa 1700 amminoacidi, è costituita da una serie di ripetizioni omologhe ad un motivo ricorrente nella sequenza dell'EGF (Epidermal Growth Factor), coinvolte nell'interazione con il ligando e in un processo di glicosilazione, mediato da una O-fucosil transferasi, essenziale per la generazione di un recettore funzionale. Le catene di carboidrati che si formano sul recettore possono essere allungate dall'azione di altre glicosil-transferasi (come ad esempio quelle appartenenti alla famiglia Fringe); è stato dimostrato che queste modificazioni alterano la capacità dei ligandi di attivare Notch (Bray, 2006).

Ciascuna ripetizione EGF-simile è lunga circa 40 amminoacidi e contiene sei residui di cisteina che formano tre ponti di-solfuro con un particolare appaiamento; il numero di ripetizioni è variabile a seconda delle diverse specie: i due recettori Notch in *C. elegans*, LIN-12 e GLP-1, contengono rispettivamente 14 e 11 ripetizioni, mentre in *Drosophila* e nei quattro recettori dei mammiferi, il numero varia da 29 a 36. La struttura prosegue verso l'N-terminale con tre ripetizioni Notch/LIN12 ricche in cisteina che prevengono un'attivazione della segnalazione di Notch in assenza del ligando; tale regione è seguita da una area ricca in amminoacidi idrofobici che formano un ponte tra il dominio extracellulare e quello trans-membrana detta dominio di eterodimerizzazione (HD). Le ripetizioni Notch/Lin12 e il dominio HD sono contenute in una regione regolativa del recettore detta NRR (*negative regulatory region*) che rappresenta una sorta di "pulsante" di attivazione del recettore.

La regione intracellulare, di circa 1000 amminoacidi, contiene un dominio RAM23 (*RBP associated molecule*) e un dominio ANK (*Notch ankyrin domain*), costituito da sette ripetizioni cdc10/ankirina lunghe circa 33 amminoacidi ognuna; queste regioni sono

coinvolte nelle interazioni proteina-proteina, ed in particolare il dominio ANK è la componente strutturale maggiormente conservata nel recettore, poiché essenziale nella trasduzione del segnale.

A seguire troviamo un dominio di trans-attivazione TAD presente esclusivamente nei recettori Notch 1 e 2 ed un dominio PEST (prolina, glutammato, serina, treonina) responsabile della stabilità della proteina (Gupta-Rossi et al., 2001; Oberg et al., 2001); in particolare il coinvolgimento di questo dominio nel turnover del recettore ha assunto una particolare importanza, alla luce dell'identificazione di nuove mutazioni con delezione del dominio PEST associate alla leucemia linfoblastica acuta (T-ALL).

Il recettore Notch di *Drosophila* e i recettori dei mammiferi Notch 1, 2 e 3, contengono inoltre due segnali di localizzazione nucleare (NSL) e una sequenza OPA (*Opposite paired*), ricca in glutammina e responsabile del processo di maturazione del recettore (FIG.13).

Come nei recettori, il dominio extracellulare dei ligandi di Notch è caratterizzato da un architettura modulare; il dominio N-terminale di tutti i ligandi, fatta eccezione per quelli di *C.elegans* (LAG-2 e APX-1), contiene una regione di circa 100 residui definita dominio MNNL (modulo N-terminale dei ligandi di Notch); inoltre, una caratteristica strutturale comune, è rappresentata da un dominio ricco in cisteina denominato DSL (Delta, Serrate, Lag-2) coinvolto nel legame con il recettore, seguito da una serie di ripetizioni EGF simili che precedono il segmento transmembrana.

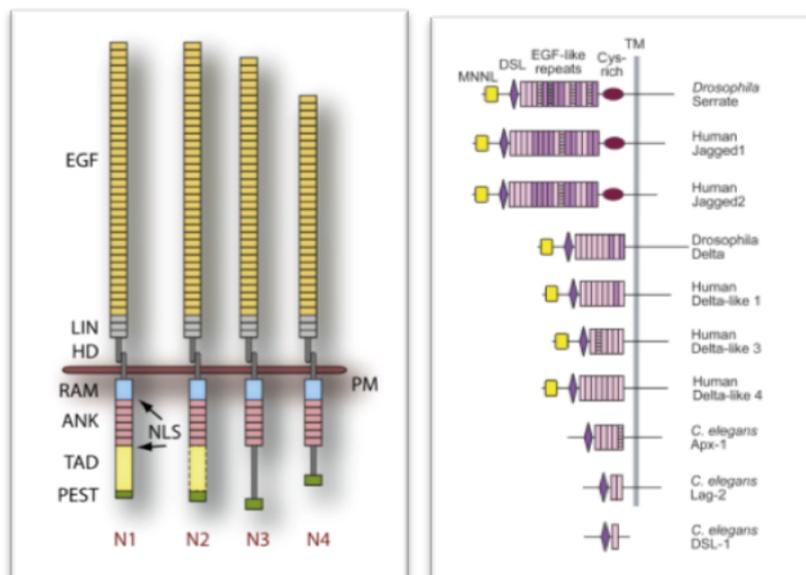


FIG.13: Rappresentazione schematica dei domini funzionali dei recettori Notch e dei loro ligandi nei mammiferi (Radtke et al., 2010; Gordon et al., 2008).

La presenza o l'assenza nella sub-unità extracellulare di un dominio ricco in cisteina (CR), localizzato tra le ripetizioni EGF simili e il dominio trans-membrana, permette di distinguere i ligandi in due classi: Jagged e Delta. Tale dominio è presente nei recettori Jagged e Serrate e assente nel recettore Delta (Gordon et al., 2008).

L'ubiquitinazione del dominio intracellulare dei diversi ligandi, media l'endocitosi del complesso "ligando-dominio extracellulare di Notch", svolgendo un importante ruolo nella trasduzione del segnale all'interno della cellula segnalante. È stato infatti ipotizzato che questa endocitosi trasmetta una forza meccanica al dominio NRR determinando l'esposizione del sito S2 e un taglio proteolitico mediato dalle metalloproteasi (Nichols et al., 2007).

5.2 La via di segnalazione di Notch

La complessità e la contesto-dipendenza caratterizzano la via di segnalazione di Notch. La complessità risulta da diversi fattori: in primis esistono diversi recettori e ligandi la cui distribuzione negli organi e le cui funzioni, sono spesso sovrapposte. Molteplici vie di segnalazione possono condurre all'attivazione di Notch, la cui segnalazione può essere ulteriormente modulata da numerose proteine intra ed extracellulari; infine il processamento del recettore stesso è interconnesso con la propria via di segnalazione, e per questo motivo i suoi livelli di espressione influenzano gli effetti della segnalazione. Queste esemplificazioni nella loro totalità aiutano a comprendere la contesto-dipendenza della via di Notch (Osborne and Miele, 1999).

La via di segnalazione intracellulare di Notch, permette a cellule equipotenti, nello stesso ambiente, di rispondere diversamente ai segnali di sviluppo. Sebbene Notch e il suo ligando si trovino spesso espressi sulla stessa cellula, questo recettore è attivato principalmente dal legame con ligandi su cellule diverse adiacenti. L'interazione può avvenire sia tra gruppi di cellule equivalenti (interazioni omotipiche) o tra cellule non equivalenti (interazioni eterotipiche). Nel primo caso si sviluppa un processo d' inibizione laterale: in un gruppo di cellule equipotenti esposte a specifici segnali di differenziamento, un limitato numero di cellule acquisisce uno specifico destino cellulare, mentre nelle cellule adiacenti il differenziamento viene inibito. Nel caso di interazioni eterotipiche la via di segnalazione è regolata principalmente dall'espressione del ligando, limitando

l'attivazione del recettore a quelle cellule in diretto contatto con le cellule che lo esprimono.

Prevalentemente la via di trasduzione del segnale di Notch viene attivata dall'interazione del ligando (DSL) con il recettore, espresso sulla superficie di cellule adiacenti causando due tagli proteolitici successivi a carico di Notch. Il primo, è mediato da metallo-proteasi appartenenti alla famiglia ADAM: ADAM 10 anche conosciuta come Kuz e TACE (*TNF α tumor necrosis factor α converting enzyme*). Il recettore viene tagliato a 12/13 amminoacidi di distanza dal dominio trans-membrana (nel sito S2), quest'ultimo viene esposto dal recettore in seguito ad un cambio conformazionale indotto dall'interazione con il ligando. Il dominio extracellulare del recettore è endocitato dalla cellula segnalante: un processo dipendente dalla mono-ubiquitinazione di un residuo di lisina nella coda citoplasmatica del ligando, per mezzo di una E3 ubiquitina ligasi. È responsabile del secondo taglio a livello del dominio trans-membrana (sito S3) una γ -secretasi appartenente a un complesso multi-proteico, contenente presenilina e nicastrina (De Strooper et al., 1999).

I due eventi proteolitici liberano il dominio intracellulare del recettore (Notch-IC). Il motivo strutturale dell'IC è caratterizzato da un dominio prossimale alla membrana, RAM (*RBP- J_k associated molecule*), seguito da sette ripetizioni ankirina-simile, da una sequenza PEST carbossi-terminale e due segnali di localizzazione nucleare (NSL), che permettono l'ingresso di Notch nel nucleo (Radtke et al., 2010). Qui la trasduzione del segnale può avvenire attraverso due diverse vie: una dipendente dal fattore CSL e l'altra indipendente da questo (**FIG.14**).

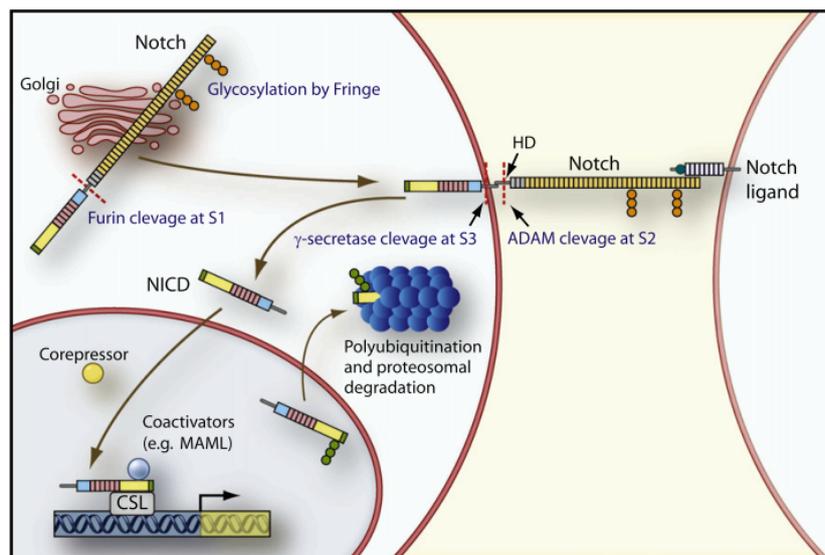


FIG.14: La via di segnalazione di Notch (Radtke et al., 2010).

L'effettore CSL è chiamato collettivamente CBF-1/RBP-J_K, Su(FIG) (*Suppressor of hairless*), Lag-1 per indicare i suoi ortologhi, presenti rispettivamente: nei mammiferi, in *D. melanogaster* e *C. elegans*.

Tramite esperimenti in vitro con arricchimenti di oligonucleotidi è stato dimostrato che CSL si lega specificamente con livelli nano-molari di affinità alla sequenza 5'-CGTGGGAA-3' (Chung et al., 1994; Tun et al., 1994) agendo come repressore in assenza del segnale mediato da Notch; CSL recluta inoltre altri fattori che formano un complesso trascrizionale multiproteico, agente come co-repressore (**FIG.15**). Nelle cellule dei mammiferi, in particolare il co-repressore CSL include SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*) anche conosciuto come NcoR (*nuclear receptor corepressor*) e SHARP che a loro volta reclutano CtBP. Anche CIR (*CBF-1 interacting corepressor*) e SKIP sono parte del complesso di co-repressione, inoltre vengono reclutate da questo complesso istone-deacetilasi, che silenziano le regioni della cromatina controllate da CSL (Bray, 2006).

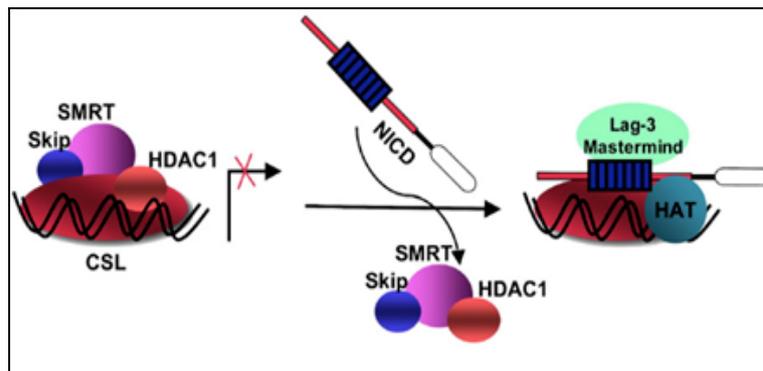


FIG.15: In assenza di NCID, CSL si trova in complesso con repressori trascrizionali (Lubman et al., 2007).

Nella via di trasduzione del segnale mediata da CSL, il dominio intracellulare di Notch trasloca nel nucleo, eterodimerizza con il DNA, legando questo fattore. L'interazione, converte il complesso di co-repressione in un attivatore trascrizionale, una volta formatosi, il complesso NCID-CSL, recluta co-attivatori quali: la proteina Mastermind (MAML1-3), MED8- complesso mediatore di attivazione trascrizionale, e l'istone acetilasi P300 per indurre l'espressione di geni target a valle.

I membri della famiglia genica Hes (*Hairy enhancer of split*) ed Hey o Hrt (*Hairy*), sono stati identificati come bersagli principali di Notch in molti tessuti, HES1 e 5. HES-1, in particolare, sono responsabili dell'espansione dei timociti più immaturi durante il

differenziamento delle cellule T, nonché del silenziamento dell'espressione del CD4 in cellule destinate a divenire CD8⁺, altri geni possono essere tessuto specifici (**FIG.14**).

Studi genetici, molecolari e biochimici, hanno dimostrato che il legame tra CSL e NICD è duplice, avviene con un'affinità maggiore e un'interazione più stabile con il dominio RAM (Kovall and Hendrickson, 2004; Lubman et al., 2007; Tamura et al., 1995) e con una minore affinità si lega invece al dominio ANK (Aster et al., 1997; Tamura et al., 1995). Al contrario il reclutamento di MAML al complesso NCID-CSL sul DNA, è indipendente dal dominio RAM e richiede esclusivamente il dominio ankirina (Nam et al., 2003).

Non tutte le vie di segnalazione indotte da Notch richiedono però l'intervento di CSL, infatti una strada alternativa coinvolge Deltex (**FIG.16**), quest'ultima è una proteina citoplasmatica zinc finger, altamente conservata che si lega alla regione intracellulare di Notch, tramite il dominio cdc10 del recettore. In particolare l'attivazione di Notch induce quella di Deltex, che a sua volta lega il fattore Grb-2, conducendo ad una repressione JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e RAS mediata della proteina E47, regolatore critico nello sviluppo delle cellule B e T (Milner and Bigas, 1999; Osborne and Miele, 1999).

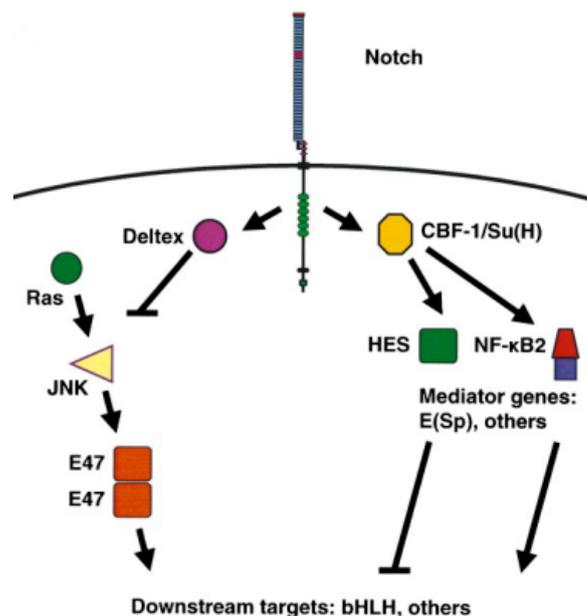


FIG.16: La trasduzione del segnale può avvenire attraverso due diverse vie: una dipendente dal fattore CSL e l'altra mediata da Deltex (Osborne and Miele, 1999).

Recenti studi effettuati, tramite analisi di espressione genome-wide e ChIP (*chromatin immunoprecipitation arrays*), puntualizzano l'esistenza di un elevato numero di geni che possono essere direttamente regolati da Notch (Weng et al., 2004). Inoltre dati emergenti, suggeriscono che la segnalazione indotta da questo recettore può cooperare con altre vie di

segnalazione, ad esempio il dominio intracellulare di Notch, può interagire con i membri della famiglia NF- κ B/Rel e I κ B, che hanno una particolare rilevanza nell'ematopoiesi; NF- κ B regola infatti numerosi geni coinvolti nell'attivazione e nel differenziamento delle cellule ematopoietiche incluse citochine, recettori per le citochine e molecole di adesione.

Notch, interagendo con la sub-unità p50 di NF- κ B, mima la funzione di I κ B, bloccando l'interazione di NF- κ B con il DNA, inibendo così l'attivazione trascrizionale dei geni regolati da questo fattore. Inoltre NCID è in grado di influenzare i livelli relativi delle sue sub-unità di NF- κ B, e di interagire con proteine I κ B, come Bcl-3, aumentandone o diminuendone la regolazione (Milner and Bigas, 1999; Bray, 2006).

Alcuni degli effetti della segnalazione di Notch sono impartiti da molecole che non sono direttamente coinvolte nella sua via di segnalazione, bensì la influenzano. Tra questi modulatori ci sono fattori che come Fringe (una glicosil transferasi), influenzano l'interazione di Notch con il ligando, ad esempio in *Drosophila*, il prodotto del gene Fringe favorisce l'interazione con Delta e inibisce quella con Serrate.

Un altro regolatore della via di Notch è Numb, sia in *Drosophila* sia in topo la distribuzione asimmetrica di questo fattore, nella progenie in seguito alla divisione cellulare, inibisce l'attività di Notch, favorendone l'endocitosi in vescicole e l'ubiquitinazione. Nel topo, invece, alcune divisioni cellulari sono simmetriche e danno origine a una progenie equivalente, in questo caso Numb è distribuito equamente. È interessante notare che nelle cellule staminali, Notch segue la distribuzione asimmetrica di Numb nelle cellule figlie; questo potrebbe determinare un'attività differenziale di Notch, che stabilisce una segnalazione preferenziale nei due progenitori.

Altro regolatore negativo è Itch, una ubiquitina E3 ligasi, che modificando Notch lo marca per la degradazione, regolandone le quantità disponibili per l'interazione con il ligando (Milner and Bigas, 1999; Bray, 2006).

Perturbazioni della segnalazione di Notch, sono spesso associate con patologie. Notch è stato implicato in diverse malattie umane, in particolare in vari tipi di tumori, tra cui la leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL), dove nel 50% dei pazienti si osservano mutazioni sporadiche nel locus di questo recettore.

Il modello di trasduzione del segnale, appena descritto, è caratterizzato da una notevole immediatezza, in quanto il dominio intracellulare di Notch è in grado esso stesso, senza intermediari, di influenzare l'espressione genica della cellula bersaglio. Tale caratteristica, aiuta a comprenderne l'elevato grado di conservazione evolutiva. In realtà, la semplicità di tale modello è notevolmente complicata dai numerosi livelli di controllo, che si esercitano

su di essa (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Il prodotto di tutti quei geni che regolano, direttamente o indirettamente la maturazione ed il traffico cellulare del recettore e dei suoi ligandi, saranno in grado di modularne l'attività.

5.3 Il recettore Notch e il suo ruolo nel differenziamento delle cellule T

Gli eventi principali coinvolti nel differenziamento delle cellule T si verificano nel timo: la proliferazione, la specificazione del destino cellulare o la morte dei progenitori derivati dal midollo osseo, sono determinate da un segnale istruttivo che può essere sia cellula-autonomo che derivante dalle interazioni con lo stroma timico. Questi segnali, inclusi quelli generati dalle stesse cellule T, come quelli provenienti dal pre-TCR e dal recettore maturo TCR $\alpha\beta$, possono essere anche controllati da regolatori biologici come i recettori della famiglia Notch, in particolare Notch1 e Notch3 (Bellavia et al., 2003; Osborne e Miele, 1999).

Infatti, i recettori Notch, vengono espressi in diversi tessuti (Artavanis-Tsakonas et al., 1999), preferenzialmente nel timo durante il differenziamento dei linfociti T. Tale processo di sviluppo, procede secondo una serie di stadi intermedi di maturazione, definibili in base all'espressione differenziata delle molecole co-recettoriali CD4 e CD8.

E' stato evidenziato un profilo d'espressione differenziale per il recettore Notch3, rispetto a Notch1, nel corso dell'ontogenesi del timo murino e nei diversi stadi dello sviluppo dei timociti nell'adulto (Felli et al., 1999). Più specificamente, l'espressione di Notch1, è alta nei timociti precoci DN (DN1 e DN2), si abbassa negli stadi successivi DN3 e DN4, raggiungendo punte leggermente più elevate nella fase di cellule DP, per risalire a livelli intermedi nelle cellule singolo positive CD4 e CD8 (Hasserjian *et al.*, 1996). Un ruolo importante di Notch1, è stato suggerito nel direzionare inizialmente i precursori linfoidi comuni provenienti dal midollo osseo in linfociti T *versus* B (Radtke et al., 1999), favorendo la linea CD8⁺ rispetto alla CD4⁺, e un recettore T $\alpha\beta$ contro $\gamma\delta$ (Washburn et al., 1997). Notch1 è infine richiesto per un corretto riarrangiamento VDJ β (Campese et al., 2003).

Inoltre, diversi studi, hanno dimostrato che in assenza del segnale mediato da Notch1, il differenziamento delle cellule T si arresta agli stadi iniziali, mentre si nota un accumulo di cellule B. La spiegazione di questo fenomeno, risiede nell'espressione dei ligandi di Notch, Delta-like 1-4, confinata alle sole cellule epiteliali del timo (TEC): infatti solo

dopo l'interazione di queste cellule con i precursori comuni multipotenti o almeno bipotenti, delle cellule B e T, si attiva la via di segnalazione di Notch che promuove il differenziamento verso la linea cellulare T, mentre i progenitori che non ricevono il segnale si differenziano in cellule B (Hosoya et al., 2010; Jenkinson et al., 2006; Sambandam et al., 2005).

Per quanto riguarda Notch3, risulta preferenzialmente espresso ad alti livelli sui timociti CD4⁻/CD8⁻ (DN3 e DN4) prima della loro transizione allo stadio di DP e viene sottoposto ad una regolazione negativa durante la conversione delle cellule dallo stadio di DN a quello successivo di DP (CD4⁺/CD8⁺), strettamente controllata dal meccanismo di segnalazione del pre-TCR.

Esperimenti in vitro, hanno evidenziato che Notch3 è importante nella maturazione da cellule doppio negative a doppio positive, evento che si correla con l'aumentata espressione del recettore indotta dalle cellule stromali timiche che ne esprimono i ligandi, Delta-like 1-4, e rilasciano segnali proliferativi e maturativi (Felli et al., 1999).

Il ruolo del recettore Notch3 nel differenziamento timocitario, è stato confermato anche nell'analisi di topi transgenici che over-esprimono il dominio intracellulare del recettore (N3-IC) (Bellavia et al., 2000).

L'espressione costitutiva di tale dominio posto sotto il controllo di un promotore specifico per i timociti immaturi (Lck), conduce, in modo riproducibile, a specifiche alterazioni nello schema differenziativo dei timociti, determinando lo sviluppo di una forma aggressiva di leucemia/linfoma linfoblastico a cellule T, ad insorgenza precoce e decorso rapido. L'analisi approfondita dei timociti pre-tumorali e delle cellule linfomatose consente di individuare nei timociti immaturi DN il bersaglio iniziale delle alterazioni indotte dalla disregolazione di Notch3. In particolare, il persistere di alcuni caratteri di immaturità, quali l'espressione del CD25 e della catena α del pre-TCR (pT α), nonché l'attivazione costitutiva del complesso NF- κ B, suggeriscono che il recettore Notch3 possa esercitare un controllo negli eventi cruciali che si realizzano nelle fasi tardive dello sviluppo dei timociti DN (DN3 e DN4), stadi in cui si verifica normalmente lo spegnimento dell'espressione del CD25 e l'aumento dell'espressione del pT α , che consentirà la formazione del pre-TCR (**FIG.17**) (Godfrey et al., 1993; von Boehmer et al., 1999).

Il ruolo dei recettori Notch nel differenziamento timocitario venne proposto per la prima volta in uno studio che identificava il potenziale oncogenetico dell'omologo umano di Notch1, TAN-1 di *D. melanogaster* (Ellisen et al., 1991). Il gene venne isolato in alcuni

pazienti affetti da leucemia T-ALL, nei quali era presente una traslocazione cromosomica, t(7;9) (q34;q34.3), che ne interrompeva la sequenza. Tale anomalia causava la fusione del dominio intracellulare di Notch1 ad elementi del promotore del gene per il TCR β , generando una forma tronca della proteina, mancante della gran parte del dominio extracellulare ed in grado di indurre un'attivazione costitutiva della “via di segnalazione” di Notch.

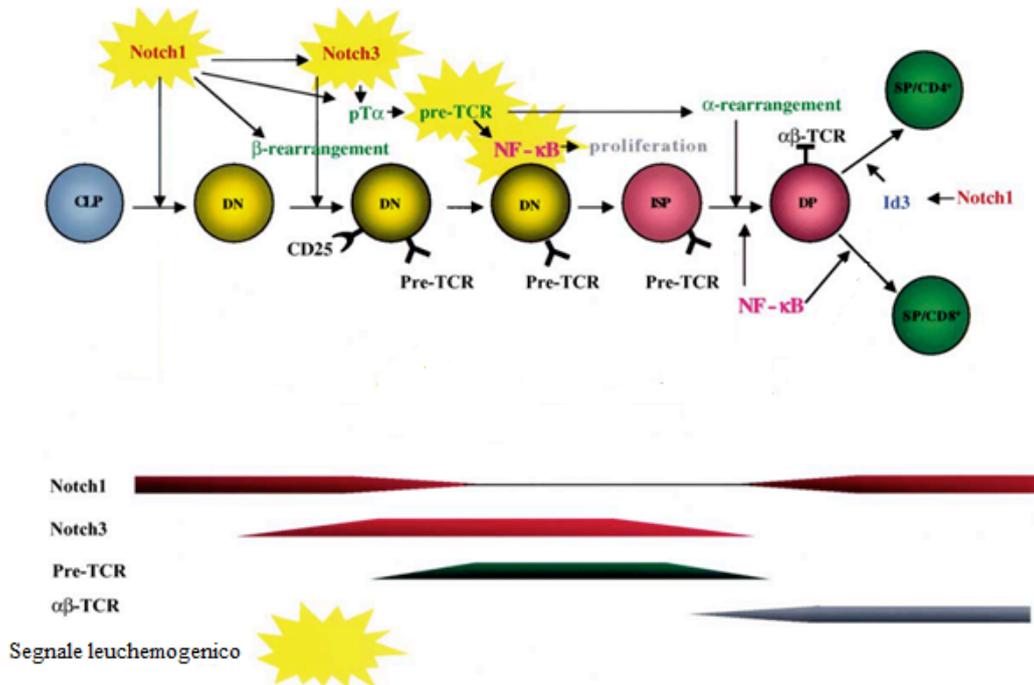


FIG.17: Modello del differenziamento timocitario: Notch1 e Notch3 svolgono un ruolo nelle diverse fasi del differenziamento timocitario e nel favorire quei segnali che portano alla sopravvivenza, alla proliferazione e infine ad eventi leuchemogenici (Campese et al., 2003).

La diretta associazione tra l'espressione di forme tronche della proteina Notch1/TAN-1 e lo sviluppo di neoplasie a cellule T è stata dimostrata in un modello murino, mediante saggi di ricostituzione del midollo osseo (Pear et al., 1996; Aster et al., 2000), nella totalità degli animali tale procedura induceva lo sviluppo di leucemie a cellule T, con fenotipo di timociti immaturi (DN e DP). Inoltre, topi transgenici esprimenti costitutivamente il dominio intracellulare di Notch1 sotto il controllo del promotore prossimale del *lck*, specifico dei timociti immaturi, manifestavano sporadicamente sviluppo di leucemie a cellule T (Robey et al., 1996; Deftos and Baven., 2000). Anche esperimenti condotti utilizzando la forma tronca, costitutivamente attiva, del recettore Notch1 umano (Allmann et al., 2001) hanno avvalorato l'ipotesi che la deregolazione

della “segnalazione” di Notch1 induceva lo sviluppo di linfomi a cellule T; infine, è stato dimostrato che la via di segnalazione di Notch1 è necessaria al sostenimento della crescita di linee cellulari leucemiche T-ALL (Weng *et al.*, 2003).

Parallelamente la caratterizzazione di un modello murino transgenico per il dominio intracellulare del recettore Notch3 (Lck-Notch3IC), costitutivamente attivo nel compartimento timocitario, ha chiarito come il coinvolgimento dei recettori Notch nei processi di linfomagenesi a cellule T sia esteso anche ad altri membri della famiglia (Bellavia *et al.*, 2000). Infatti, i topi transgenici Lck-Notch3IC sviluppano precocemente una forma molto aggressiva di leucemia/linfoma a cellule T, il cui decorso clinico ricorda le T-ALL dell’infanzia (Bellavia *et al.*, 2002).

5.4 Il topo transgenico per Notch3 come modello della leucemia linfoblastica acuta a cellule T

Per saggiare l’abilità di Notch3 nell’influenzare lo sviluppo delle cellule T, è stato generato un topo transgenico che over-esprime la forma intracellulare attiva del recettore Notch3 (N3-IC). Il gene codificante questo recettore è stato clonato a valle del promotore prossimale del *lck* (specifico per i timociti) in grado di indurre un’attivazione della segnalazione intracellulare di Notch3 indipendentemente dall’interazione con il ligando. All’estremità 3’ di N3-IC è stata fusa una sequenza dell’emoagglutinina (HA) del virus dell’influenza umana, che fornisce un epitopo non murino, permettendo quindi di discriminare tra l’espressione del gene endogeno e del transgene inserito. A valle del frammento N3-IC sono presenti sequenze e sito di poliadenilazione del gene che codifica per l’ormone della crescita umano (hGH), che hanno la funzione di aumentare l’efficienza d’espressione del transgene stesso (**FIG.18**).

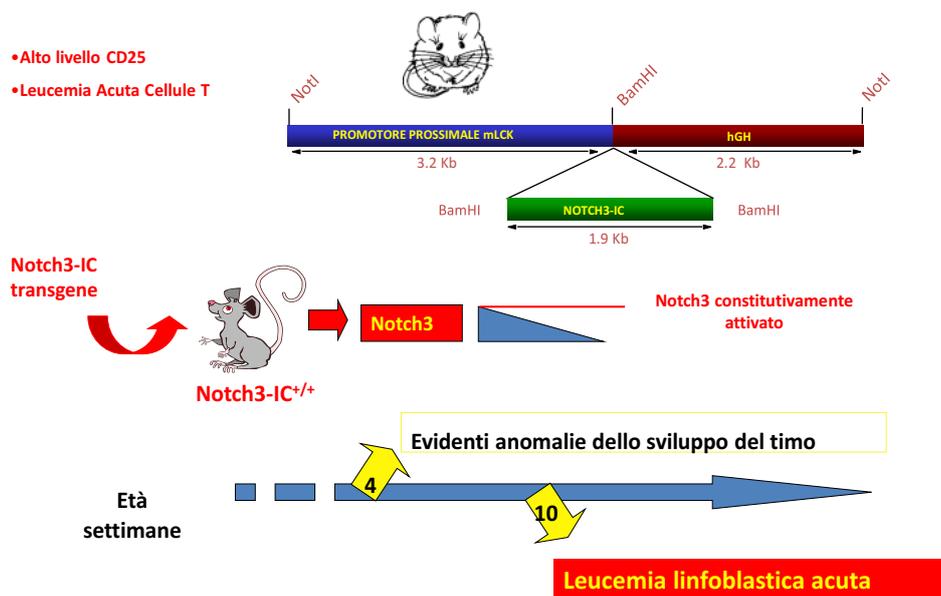


FIG.18: Generazione del topo transgenico Notch3-IC.

L'attivazione costitutiva della segnalazione di Notch nel topo transgenico è dimostrata da un'aumentata espressione di geni target della segnalazione quali HES-1, HES-5 e Deltex. L'immunofenotipo del timo dimostra un incremento nel numero assoluto dei timociti, sebbene nessuna alterazione nella distribuzione delle quattro principali sottopopolazioni, DN, DP e SP, è rilevabile. L'overespressione di N3-IC causa superate le sette settimane di vita, l'insorgenza e sviluppo di una forma aggressiva, precoce di leucemia-linfoma con un decorso clinico rapido che ricorda la T-ALL umana dell'infanzia (Bellavia et al. 2000).

Il fenotipo dei timociti alterati è caratterizzato dalla persistente espressione in superficie del CD25 (recettore per l'interleuchina-2, che normalmente viene reso silente durante la transizione DN3/DN4) e della catena invariante alpha del pre-TCR (pT α) che consente la formazione del complesso del pre-TCR, che nel topo N3-ICtg non viene spento in periferia nelle cellule SP (milza e linfonodi mesenterici).

Analizzando gli stadi di sviluppo dei timociti immaturi DN, sulla base del CD44 e CD25, si osserva nel topo N3-ICtg rispetto al WT un alterato differenziamento, testimoniato da un incremento delle sotto-popolazioni DN2 (CD44⁺/CD25⁺) e DN3 (CD44⁻/CD25⁺) rispetto alle DN4 (CD44⁻/CD25⁻). Questo dato è consistente con il mancato spegnimento del CD25. L'attivazione di vie di sopravvivenza sembra essere un'altra caratteristica saliente delle

Tg

DN del N3-ICtg che mostrano una ridotta percentuale di DN in apoptosi rispetto al WT (FIG.19).

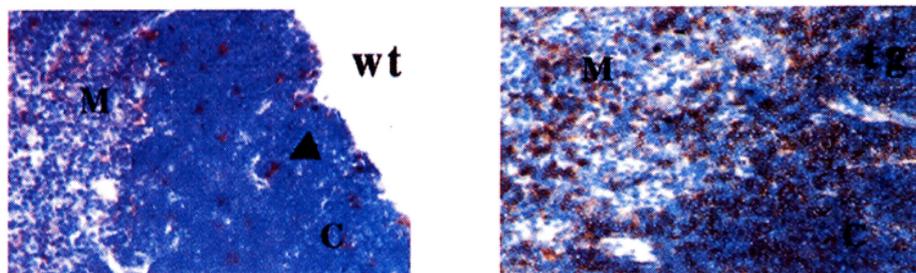


FIG.19: Distribuzione dei timociti nel cortex e nella medulla del timo di topi WT e Tg.

Nei timociti totali non frazionati del topo N3-ICtg si riscontra una diminuzione dell'espressione dell'inibitore della chinasi ciclina dipendente p27 e di contro l'aumento della proteina anti-apoptotica Bcl2A1, così come l'aumento dei livelli di mRNA dell'interleuchina(IL-)-2, dell'interferone gamma (IFN γ), di IL-4 e di Tumor Necrosis Factor (TNF- α). Ciò suggerisce che l'over-espressione di Notch-3 deregola precocemente la crescita dei timociti.

Nel differenziamento timocitario sono stati descritti due picchi di attività NF- κ B: nella transizione tra i vari stadi DN nelle cellule singolo positive CD8 (Bellavia et al., 2000). L'aumentata attività di questo fattore nucleare si correla con l'attivazione di geni coinvolti nell'apoptosi e favorisce la proliferazione delle cellule DN in risposta al segnale proveniente dal pre-TCR. Studi più approfonditi condotti su modelli murini doppio mutanti, transgenici per Notch3-IC e knock-out per pT α (Notch3IC/pT α ^{-/-}) hanno dimostrato che la delezione del gene pT α , nei topi transgenici Lck-Notch3IC è in grado di abrogare in modo consistente il processo di tumorigenesi, e d'altra parte, l'espressione costitutiva del dominio intracellulare di Notch3, è in grado di assicurare un recupero significativo del blocco differenziativo allo stadio DN, che normalmente si ha nei topi pT α ^{-/-} (Bellavia et al., 2002).

È stato successivamente dimostrato che la segnazione del pre-TCR induce anche un'attivazione di NF- κ B ligando-indipendente e che tale attivazione è mediata da una proteina chinasi (PK)C: PKCtheta. L'attività di questa proteina è aumentata nei timociti dei topi transgenici N3-ICtg rispetto ai WT, la sua delezione nel topo transgenico riduce drasticamente l'attivazione della via di NF- κ B evento correlato a una minor incidenza della leucemia (Felli et al., 2005). Il nostro topo N3-ICtg mostra come caratteristica saliente

l'attivazione costitutiva delle vie di attivazione NF- κ B: canonica PKC θ -IKK β -dipendente e alternativa IKK α -dipendente, suggerendo un ruolo di questo fattore nella deregolazione trascrizionale dei geni antiapoptotici. Più recentemente è stato dimostrato che la PKC θ , target fondamentale della via di segnalazione di Notch3, regola positivamente l'espressione del fattore nucleare Foxp3 attraverso la via NF- κ B p65-dipendente ed è correlato all'incremento di cellule Treg-Foxp3⁺ osservate nel N3-ICtg (Barbarulo et al. 2011).

Insieme questi dati identificano nell'over-espressione della forma attiva di Notch3 come un segnale che conduce alla deregolata crescita e differenziamento dei timociti attraverso la transizione da cellule Pre-T a cellule T, all'attivazione costitutiva di NF- κ B e del preTCR eventi strettamente correlati nella tumorigenesi delle cellule T.

5.5 Alterazioni d'organo nel topo N3-IC Tg

Gli animali transgenici sembrano normali fino a sette settimane d'età, successivamente evolvono rapidamente una patologia caratterizzata da: letargia, postura ricurva e addome disteso; i topi mostrano inoltre un aumento delle dimensioni e del peso della milza, dei linfonodi periferici e una iperplasia del timo, insieme a queste osservazioni si evidenziava una completa perdita della normale architettura degli organi.

Infatti, il deregolato differenziamento dei timociti nel topo N3-ICtg si traduce anche in una disorganizzazione della normale architettura del timo, come dimostrato dall'analisi istologica.

Analisi su sezioni al criostato fissate in acetone mostrano una evidente delocalizzazione delle cellule CD25⁺ irregolarmente sparse nella cortex, mentre molte delle cellule corticali e midollari sono CD25⁺ in associazione ad una massiva infiltrazione da parte di una nuova popolazione monotona di cellule linfoblastiche.

Inoltre, le massive infiltrazioni tumorali rilevate in organi come il fegato, i polmoni, i reni e il midollo osseo testimoniano infine l'esistenza di una fase leucemica della malattia neoplastica (**FIG.19**) (Bellavia et al., 2000).

Il nostro transgenico Lck-N3IC rappresenta un ottimo modello di malattia dove studiare gli effetti del cross-talk fra la segnalazione di due recettori Notch3 e CXCR4 entrambi coinvolti nei processi di maturazione dei timociti immaturi ed il loro ruolo in numerosi tumori ematopoietici. Tutto allo scopo di meglio delucidare le vie molecolari attraverso le

quali preTCR, NF- κ B and CXCR4 cooperano al potenziale linfoma genico di Notch3 nell'innescò della leucemia-linfoma a cellule T.

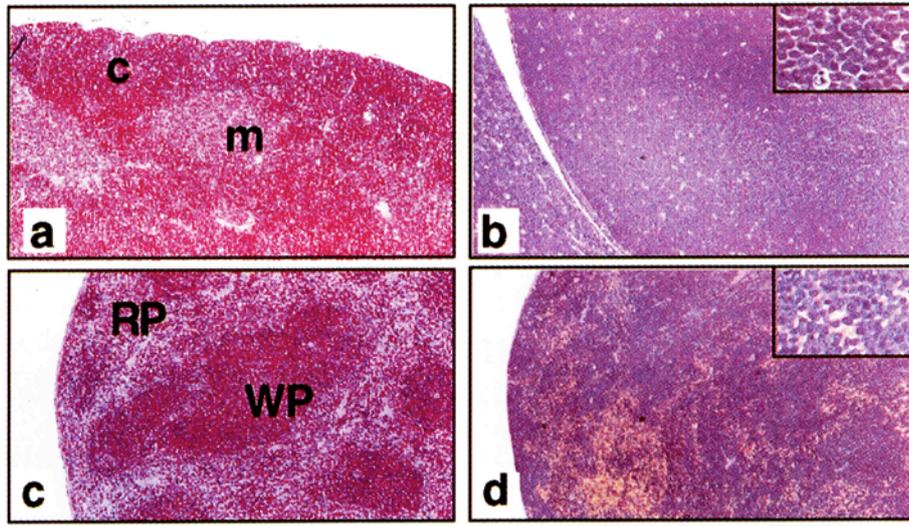


FIG.20: Distruzione dell'architettura del timo (a e b), e milza (c e d) nei topi transgenici (b e d) rispetto al WT (a e c) dovuta alla sostituzione delle normali componenti con popolazioni di cellule linfoblastiche. C=cortex, M=medulla, RP=polpa rossa, WP=polpa bianca (Bellavia et al., 2000).

6. ARRESTINA E NOTCH

La via di segnalazione di Notch è altamente controllata mantenendo un numero limitato di recettori funzionanti sulla superficie cellulare. I recettori Notch sono costitutivamente internalizzati e ubiquitinati dall'ubiquitina E3 ligasi AIP4/Itch, in modo da essere processati tramite degradazione lisosomiale. La prima evidenza del coinvolgimento delle arrestine nella regolazione di Notch avvenne in *Drosophila* (Mukherejee et al., 2005) in seguito all'identificazione di Kurtz (*krz*), unico omologo delle β -arrestine nei mammiferi e unico interattore di Deltex. Il recettore Notch non attivo raggiunge l'endosoma mediante la formazione di un complesso che comprende β -arrestina 1 o 2 le quali formano un eterodimero con α -arrestina 1 (ARRDC1) così che Notch può essere ubiquitinato e successivamente inviato ai lisosomi per la degradazione. (Puca et al., 2013) (FIG.21).

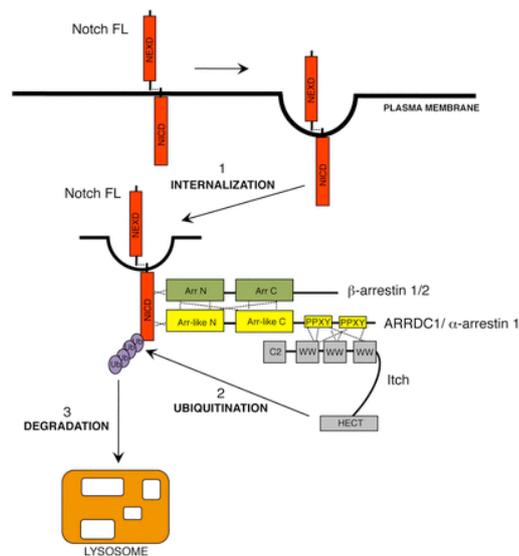


FIG.21: Modello del complesso degradativo di Notch (Puca et al., 2013).

SCOPO DEL LAVORO

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è un'emopatia maligna caratterizzata da un elevato numero di linfoblasti T nel midollo osseo e circolanti nel sangue. La T-ALL rappresenta il 10-15% dei casi di leucemia linfoblastica acuta in età pediatrica ed il 25% dei casi in età adulta. Inoltre, è spesso associata a prognosi più sfavorevole rispetto alle più comuni leucemie linfoblastiche acute a cellule B (B-ALL). La T-ALL si presenta clinicamente con conte elevate di globuli bianchi nel sangue, adenopatia e coinvolgimento del sistema nervoso centrale.

L'insorgenza della malattia è legata ad eventi di trasformazione che avvengono in punti cruciali del processo di differenziamento intratimico delle cellule T (de Lourdes Perim et al., 2015). Tra le vie di signaling maggiormente coinvolte in questo tipo di neoplasia figura quello governato dai recettori Notch1 e Notch3, che rivestono un ruolo importante nelle scelte differenziali durante lo sviluppo dei timociti più immaturi. Infatti, la T-ALL umana spesso origina da mutazioni con acquisto di funzione del gene Notch1 (Weng et al., 2004; Bellavia et al., 2002), mentre recentemente, è stata dimostrata la presenza di mutazioni attivanti il gene Notch3 (Bernasconi-Elias et al., 2016).

Grazie all'attivazione costitutiva della via di segnale di Notch3 nei timociti immaturi del modello murino creato nel nostro laboratorio, ovvero il topo transgenico N3-ICtg, è stata dimostrata la funzione di tale recettore come oncogene nella T-ALL. Il topo transgenico N3-ICtg sviluppa una forma di leucemia a cellule T che ricapitola alcune delle caratteristiche della T-ALL umana. (Bellavia et al., 2000). In tale modello di T-ALL si osserva un' aumentata e persistente espressione della catena pT α del pre-TCR in tutte le sottopopolazioni timocitarie ed è stata anche osservata una deregolazione della proliferazione e della maturazione nella fase di transizione da cellule preT a timociti T (Bellavia et al., 2002).

Nel microambiente timico, i precursori dei timociti progressivamente maturano sfruttando la moltitudine di segnali che vengono inviati da e verso lo stroma. Quest'ultimo produce molecole quali citochine, chemochine e ligandi che sono capaci di sostenere e promuovere molti processi maturativi dei timociti (Sun et al., 2010). Di nostro interesse è stato in particolare l'asse CXCR4-CXCL12, perchè quando CXCR4 è espresso nei timociti immaturi regola la loro migrazione all'interno del microambiente timico in risposta al gradiente di CXCL12 prodotto dalle cellule stromali. CXCR4 è un recettore a sette domini

transmembrana associato a proteine G, espresso sulla superficie di diversi tipi cellulari, come linfociti, cellule staminali ematopoietiche, cellule epiteliali, endoteliali e tumorali. Il signaling di CXCR4-CXCL12 è fondamentale per determinare la migrazione dei progenitori ematopoietici nel midollo osseo durante lo sviluppo embrionale. Nell'organismo adulto controlla invece la mobilizzazione e il riversamento di queste cellule dal midollo osseo nel torrente circolatorio e verso il sangue periferico in condizioni sia fisiologiche che patologiche. È noto che il CXCR4, presente sui timociti dallo stadio DN1 a DP regola la migrazione nella progressione differenziativa dei timociti (Plotkin et al., 2003). È altresì noto che l'asse CXCR4/CXCL12 insieme a pre-TCR e Notch ha un ruolo importante nella selezione beta, che aumenta la sopravvivenza e la proliferazione dei timociti immaturi. Per consentire il differenziamento dei timociti T dallo stadio DN a quello di DP il signaling di Notch deve cooperare con i signaling del pre-TCR e di CXCR4-CXCL12 (Janas et al., 2010). Siccome sia il recettore Notch che il CXCR4 sono coinvolti in numerosi passaggi maturativi del differenziamento timocitario, lo scopo del nostro lavoro è stato di capire la correlazione che possa esistere tra le due vie. Questo interesse per le due vie parte dall'ipotesi che un possibile crosstalk possa avere un effetto sulla deregolazione del differenziamento e sulla migrazione dei linfociti T immaturi associati all'insorgenza della T-ALL.

Sebbene l'iperattivazione del signaling di Notch è associata allo sviluppo della T-ALL, i meccanismi che sono alla base della diffusione delle "cellule pre-leucemiche" non sono ancora ben chiari. Molti modelli di leucemia T-ALL Notch-indotta presentano un'anomala e precoce circolazione di cellule $CD4^+CD8^+$ (DP) nel sangue. Partendo da questi presupposti, ci siamo interessati allo studio dell'anomala propagazione dei timociti immaturi $CD4^+CD8^+$ ritrovati fuori dal timo negli stadi precoci e tardivi della T-ALL, sviluppata nel topo N3-ICtg. Quello che ci proponiamo di comprendere sono i meccanismi molecolari attraverso i quali l'iper-espressione di Notch3 possa modulare la presenza di CXCR4 in membrana, contribuendo a deregolare le capacità di migrazione delle cellule $CD4^+CD8^+$. Al fine di analizzare come la via di trasduzione di CXCR4 abbia un ruolo nella diffusione dei timociti immaturi effettueremo esperimenti di migrazione sotto lo stimolo di SDF-1 e analisi trascrizionale di CXCR4 e di SDF-1 in queste cellule. Inoltre, esperimenti di selezione dei timociti $CD4^+CD8^+$ dal topo N3-ICtg e loro trasferimento *in vivo* in topi riceventi immunocompromessi ci permetteranno di valutare la capacità d'infiltrazione e di attecchimento di queste cellule in organi periferici. Nostro obiettivo è prendere in considerazione anche l'antagonismo farmacologico del recettore CXCR4, con

somministrazione *in vivo* di AMD3100, per valutare gli effetti biologici conseguenti a tale inibizione. Infine, con l'ausilio di esperimenti *ex vivo* ed *in vitro* indagheremo il ruolo svolto dalla β -arrestina nei processi di internalizzazione e riciclo in membrana del recettore CXCR4 nelle cellule CD4⁺CD8⁺ del N3-ICtg rispetto al WT. Concludendo, i risultati di questi esperimenti forse potranno portare ad una più profonda conoscenza dei meccanismi molecolari della T-ALL e di conseguenza consentire nuove opportunità terapeutiche della malattia.

MATERIALI E METODI

Modelli murini

Gli esperimenti sono stati effettuati su topi con genotipo diverso, ma tutti con lo stesso “background” genetico: C57/Bl6 (BK8). Sono stati utilizzati topi WT e topi transgenici (N3-ICtg). La generazione e la tipizzazione fenotipica di questo modello murino transgenico, è descritta nella referenza Bellavia D. et al., 2000. Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi di 3, 6-8 e di 12-14 settimane di età, il numero di animali utilizzati per ogni esperimento era tre per ogni genotipo. I topi immunocompromessi usati come riceventi: NOD.Cg-Prkdc^{scid} (NSG) sono stati acquistati dai laboratori Charles River.

Colture cellulari

Le linee cellulari Hek293 e TALL-1 sono tenute in coltura come è stato descritto in Bernasconi-Elias et al., 2016 e in Pellulo et al., 2014. Tutte e due le linee erano sottoposte al test di micoplasma risultando negative.

Trasfezioni cellulari e plasmidi

La linea cellulare Hek293 è stata trasfettata con TransFectin™ Lipid Reagent (BioRad) come descritto in Massimi I. et al., 2015. I plasmidi utilizzati sono i seguenti: pCMV-Notch3-IC-HA (Bellavia et al., 2000), pcDNA3-β arr1-HA, and pcDNA3-β arr1-S412D-Flag (entrambi sono stati offerti da Robert Lefkowitz; Addgene plasmid #42196, Luttrell et al., 1999).

Silenziamento del RNA (siRNA) e successiva analisi al FACS e Western Blot

Le cellule umane TALL-1 sono state trasfettate con 200nM di siRNA anti-Notch3 (Santa-Cruz, sc-37135 oppure Dharmacon, s1623) e con il corrispondente controllo (CTRL) (Santa-Cruz, sc-37007 oppure Dharmacon, D-001810-10-20) usando il sistema di trasfezione con elettroporazione Neon (Invitrogen) seguendo le istruzioni del kit. 96 ore

dopo la trasfezione le cellule sono state analizzate al FACS. Anche estratti cellulari proteici totali (WCE) sono stati effettuati come nella referenza Vacca A. et al., 2006 per svolgere la tecnica di Western Blot. Per l'analisi al FACS le cellule sono state colorate con anti-CXCR4 (BD-Biosciences,560936) oppure con l'isotipo di controllo IgM isotype (eBioscience, 17-4341) e poi analizzate al FACSCalibur con il software di CellQuest. Le proteine sono state separate su gel SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa successivamente sono state incubate con i seguenti anticorpi: Phospho- β -arrestin1 Ser412 e Notch-3 (entrambi Cell Signaling, codice: 2416 e 2889 rispettivamente), Anti-CXCR4 (ABCAM, cod. 2074), Anti- β -Actin (Sigma-aldrich, cod. A5441); P-Erk, β -arrestin1, Erk-1, Erk-2, α -tubulin, anti-LamininB (tutti Santa Cruz Biotechnology, cod. sc-7383, sc-9182, sc-sc-93, sc-154, sc-803, sc-6217 rispettivamente).

Frazionamento cellulare

Le cellule DP/ CD8⁺ purificate di topi WT e N3-ICTg sono ottenute con le biglie CD8a (Ly-2) microbeads e le colonne LS di Miltenyi-Biotec seguendo il protocollo del kit. Il frazionamento cellulare (nucleo-citoplasma) sulle TALL-1 e sui timociti DP selezionati (cellule DP/CD8⁺) da topi WT e N3-ICTg è stato effettuato come nella referenza Vacca et al., 2006.

Estrazione del RNA, RT-PCR/qRT-PCR

RNA totale è stato estratto con il kit TRIzol® Reagent (ambion RNA, Life technologies) dalle cellule TALL-1 e/o dalle cellule DP/CD8⁺ purificate di topi WT e N3-ICTg; l'RNA è stato sottoposto a RT-PCR come descritto in letteratura (Felli et al., 1999). L'espressione del mRNA di CXCR4 e HPRT è stata monitorata utilizzando gli AoD TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies Brand, Carlsbad, CA, USA). I dati sono analizzati con il metodo di $\Delta\Delta C_t$.

Test di migrazione

Il test chemiotattico con CXCL12 (SDF-1) e SLC, rispettivamente alla concentrazione di 20 ng/ml e 200 ng/ml per il primo e di 1 μ g per il secondo, è stato allestito utilizzando

particolari inserti (Costar), che consentono di generare una camera superiore ed una camera inferiore, costituita da un pozzetto di una piastra da 24, grazie alla presenza di una membrana porosa alla loro base (pori da 5 μm di diametro). In questo modo è possibile valutare la migrazione delle cellule posizionate al di sopra dell'inserto (1×10^6 timociti) verso la camera inferiore in cui è presente la chemochina disciolta nel mezzo di migrazione (RPMI+0,5% BSA+ 25mM HEPES). Ogni campione è stato valutato in duplicato, pozzetti contenenti solo il terreno, sono stati utilizzati come controllo negativo. Dopo 90 minuti, il contenuto presente nella camera inferiore di chemiotassi è stato trasferito in un tubo di polipropilene in seguito alla rimozione della membrana-inserto.

Le cellule sono state quindi centrifugate a 300 g per 10 minuti e risospese in 20 μl di soluzione contenente l'anticorpo anti-CD16/32 (24G2). A questo punto le cellule dei campioni 2×10^6 cellule totali, sono state incubate in ghiaccio per 10 minuti e sono stati aggiunti gli anticorpi appropriati. I campioni cellulari sono stati nuovamente incubati in ghiaccio per 30 minuti, lavati con 2 ml di soluzione di colorazione e risospese in 200 μl della stessa. Ogni campione è stato acquisito per un tempo calcolato sulla base della rarità dell'evento, pari a 150 secondi; la migrazione cellulare è stata valutata sulla base delle cellule attivate fluorescenti (FACS).

I risultati sono espressi come percentuale di cellule migrate, percentuale calcolata con la formula: eventi acquisiti per il campione/eventi acquisiti per il controllo positivo *100.

Analisi citofluorimetrica

Le cellule TALL-1 e le cellule estratte da timo, sangue e midollo osseo (femori e tibie) da topi WT e N3-ICtg sono state preparate come nella referenza Felli MP et al., 2005. Gli anticorpi usati per le colorazioni su topo sono elencati di seguito: CD4 PerCP (Rat Anti-Mouse, clone RM4-5, 550954, BD Bioscience Pharmingen), CD8 APC (Rat Anti-Mouse, clone 53-6.7, 553035, BD Bioscience Pharmingen), anti-AnnexinV-APC (BD-Biosciences, 550474), CXCR4 PE (CD184, clone 2B11, eBioscience) e relativo controllo isotipico IgG2b PE, Notch3 FITC murino (R&D Systems; Cat#AF1308) o le normal goat IgG (R&D Systems; Cat#AB-108-C) usate come controllo negativo. Dai timociti estratti *ex vivo* da topi transgenici N3-ICtg sono state selezionate le cellule DP ($\text{CD4}^+\text{CD8}^+$) su colonne LS (MACS separation column) attraverso microbiglie $\text{CD8}\alpha$ (Ly-2) (Miltenyi Biotec). Le cellule ottenute dalla colonna, arricchite per le popolazioni DP/ CD8^+ sono state quindi marcate con anticorpi specifici: anti-CD4 PerCP e anti-CD8 APC per verificare la

purezza e la percentuale delle doppie positive ottenute tramite FACSCalibur (BD Biosciences) ed analizzate mediante il programma CellQuest (Becton Dickinson). Le cellule TALL-1 sono state colorate con CD4 APC, CD8 FITC (BD Biosciences), Anti-Human CD184 APC (BD Pharmingen™) o Rat IgM APC usato come controllo isotipico (Affymetrix eBioscience) e Notch3 umano (R&D system), IgG1 monoclonale di topo (R&D), Anti-Mouse IgG Phycoerythrin (R&D). L'acquisizione è stata effettuata o al FACSCantoII (Becton-Dickinson) con il software di DivaVersion6.1.3 oppure FlowJoVersion8.5.2 oppure al FACSCalibur con il software di CellQuest.

Selezione delle cellule (sorting) e trasferimento dei timociti DP N3-ICtg in vivo

Una sospensione di timociti da topi N3-ICtg di 8 settimane è stata colorata con anticorpi anti-CD4-PerCP-Cy5.5, Anti-CD8-APC, Anti-CXCR4-PE e anti-Notch3 al fine di isolare con il FACS Aria cell sorter (BD Biosciences) le cellule CD4⁺CD8⁺Notch3^{high}CXCR4^{high} (N3^{high}) e CD4⁺CD8⁺Notch3^{low}CXCR4^{high} (N3^{low}). 2-3 milioni di cellule appartenenti alle sottopopolazioni isolate sono state separatamente iniettate intravena in topi immunodeficienti NSG, dopo 1 e 10 giorni dall'iniezione, 2 milioni di cellule isolate dalla milza, dal midollo osseo, di questi recipienti primari sono state risospese in PBS per la colorazione con i seguenti anticorpi: anti-CD4 PerCP-Cy5.5, Anti-CD8 APC, Anti-CXCR4 PE e Anti-Notch3 Fitch. L'analisi citofluorimetrica è stata svolta utilizzando il FACSCanto II (Becton Dickinson), i dati sono stati elaborati con il programma Diva versione 6.1.3 or FlowJo versione 8.5.2. I codici degli anticorpi utilizzati sono menzionati nel paragrafo dell'analisi citofluorimetrica.

In vivo somministrazione di AMD3100

Topi transgenici N3-ICtg di 3-4 settimane di età sono stati iniettati nel peritoneo con una somministrazione giornaliera di AMD3100 (10mg/kg; Sigma-Aldrich) oppure con il veicolo (PBS). Analisi al FACS delle cellule provenienti dal midollo osseo è stata effettuata al giorno 10. Gli anticorpi utilizzati sono menzionati nel paragrafo dell'analisi citofluorimetrica.

Colorazione in vivo con BrdU e colorazione ex vivo con Ki67

Topi di N3-ICtg di 8 settimane sono stati iniettati nel peritoneo con 1,5mg/150ml BrdU (Sigma-Aldrich, B9285) risospesa in PBS; 24 ore dopo l'iniezione, è stata effettuata una colorazione extracellulare con anti-CD4/Anti-CD8/anti-Notch3 e o con anti-BrdU (Biolegend, 339807) oppure una colorazione intracellulare con BV510mouse anti-Ki67 (BD-563462).

In silico analisi dei dati depositati di pazienti affetti da T-ALL

Campioni di sangue da 117 pazienti pediatriche affette da T-ALL (Homminga et al., 2011) sono stati selezionati e analizzati per la correlazione tra CXCR4 e ARRB1. Sono stati utilizzati sonde di espressione 217028_at che rappresentano CXCR4 e 222912_at che rappresentano ARRB1.

Analisi statistica

I risultati sono riportati come la media \pm la deviazione standard (SD) di almeno tre esperimenti indipendenti; in ogni figura come 'n' è indicato il numero degli esperimenti effettuati. Il test t di Student è stato utilizzato per calcolare la significatività delle differenze tra due gruppi. Per analisi comparative di più di due gruppi abbiamo utilizzato one way ANOVA (Tukey' s post-test). Un valore $P \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. ($*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$ e $***P \leq 0.001$; $**** P \leq 0.0001$). Le densitometrie sono state effettuate scannerizzando le lastre ottenute dai Western Blot usando il programma Image J. I grafici riportati sono stati realizzati con PRISM-program (GraphPad).

L'elevata espressione di CXCR4 sulla superficie cellulare correla con l'aumentata capacità di migrazione dei timociti DP del topo N3-ICtg

Il topo N3-ICtg è caratterizzato da un anomalo sviluppo delle cellule preT/T, dalla attivazione costitutiva di NF- κ B dipendente dalla proteina chinasi C (PKC) θ , dalla persistente espressione in superficie del CD25 (normalmente reso silente durante la transizione DN3/DN4) e della catena invariante alpha del pre-TCR (pT α) (Bellavia D. et al., 2000; Felli MP et al., 2005; Fig A. et al., 2006; Bellavia D et al., 2002). Il ruolo dell'asse SDF-1/CXCR4 nella transizione dallo stadio di DN a DP (DN/DP) insieme alla sua rilevanza nelle T-ALLs (Janas et al., 2010) ci hanno spinto ad analizzare l'espressione di CXCR4 nelle cellule T DP circolanti in modo anomalo nei topi transgenici N3-ICtg. Come prima cosa abbiamo osservato per singola cellula, una più alta espressione in superficie di CXCR4 sui timociti DP dei topi transgenici, come evidenziato dalla differenza significativa della Mean Fluorescence Intensity (MFI) tra timociti DP selezionati di topi WT e N3-ICtg (**FIG.22A**). Tale incremento non sembra essere modulato a livello trascrizionale (**FIG.22B**). Inoltre, non ci sono differenze nell'espressione del ligando SDF-1 confrontando timociti DP di WT e N3-ICtg, cellule in cui risulta comunque scarsamente espresso (dati non mostrati). Quindi, i nostri dati suggeriscono un meccanismo leucemico cellula-autonomo, che esclude la produzione autocrina di SDF-1 come riportato nel lavoro di Passaro D. et al., 2015 e Pitt LA et al., 2015. A supporto di questa ipotesi abbiamo infatti osservato una diminuzione dell'espressione in mRNA di SDF-1 analizzando il timo in toto del N3-ICtg rispetto al WT (**FIG.22C**). L'asse SDF-1/CXCR4 regola la maturazione dei timociti dirigendo e trattenendo le cellule DP nella corteccia timica (Halkias et al., 2013). L'aumentata espressione in superficie correla con la funzione di CXCR4, infatti in risposta a SDF-1 la migrazione dei timociti DP transgenici aumenta rispetto al WT in modo dose dipendente (**FIG.22D**). Quindi, i timociti transgenici DP con una più alta espressione in superficie di CXCR4 rispondono meglio allo stimolo chemiotattico di SDF-1, la cui diminuita espressione nel microambiente timico (**FIG.22C**) del topo N3-ICtg potrebbe alterare la progressiva maturazione nella corteccia timica, ed aumentare la responsività delle DP a stimoli esterni.

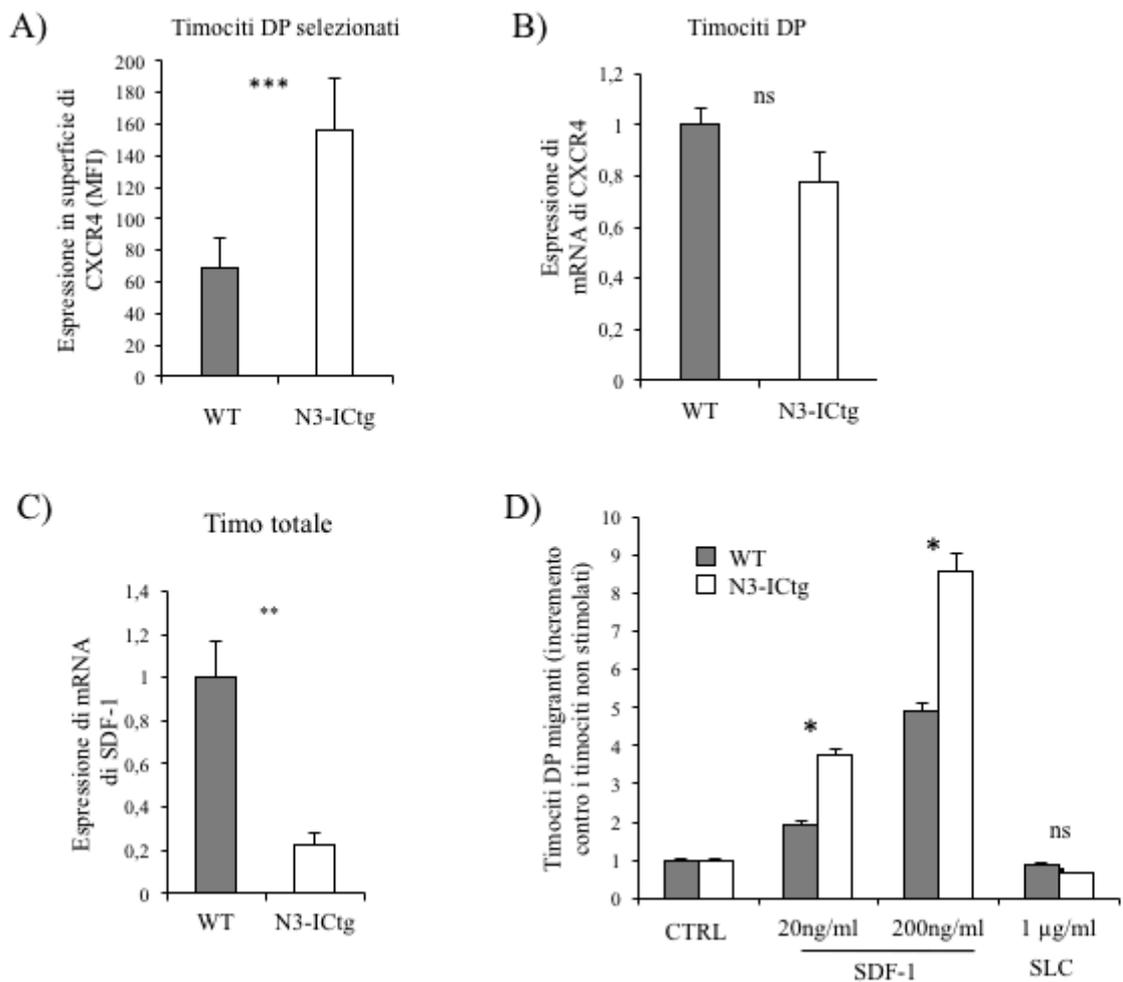


FIG.22: Notch3 aumenta l'espressione in superficie di CXCR4 nei timociti DP aumentandone la capacità migratoria. A) Su timociti isolati *ex vivo* da topi WT e N3-ICtg è stata analizzata l'espressione in superficie di CXCR4 attraverso la citofluorimetria. La Mean Fluorescent Intensity (MFI) delle cellule DP selezionate (DP-gated cells) è stata calcolata su topi con un'età compresa tra le 6 e le 8 settimane (n=5 per ogni genotipo). B) Sul RNA totale estratto da timociti DP di topi WT e N3-ICtg di 6-8 settimane (n=3 per ogni genotipo) è stata analizzata tramite qRT-PCR l'espressione di mRNA di CXCR4. C) Sul RNA totale estratto da timociti DP di topi WT e N3-ICtg di 6-8 settimane (n=3 per ogni genotipo) è stata analizzata tramite qRT-PCR l'espressione di mRNA di SDF-1. D) Abilità migratoria dei timociti DP WT e N3-ICtg in risposta a 20ng/ml e 200ng/ml di SDF-1 o ad un ligando non correlato (secondary lymphoid tissue chemokine, SLC), valutata come incremento delle percentuali dei timociti DP migranti in risposta a SDF-1, contro i timociti non stimolati di controllo (CTRL). I risultati sono riportati come la media \pm la deviazione standard (SD) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, not significant; Student's t-test)

Le cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺ aumentano competitivamente nel timo del topo N3-ICtg.

Rispetto al WT le percentuali di cellule T DP a 3 e 6-8 settimane restano invariate nel topo transgenico (**FIG.23A e B**). L'alta espressione di CXCR4 (**FIG.22A**) e la persistenza di Notch3 in superficie ci hanno spinto a valutare l'espressione combinata dei due recettori sui timociti CD4⁺CD8⁺ a differenti età.

A 3 settimane, i timociti DP selezionati, mostrano una percentuale più alta di cellule Notch3⁺CXCR4⁺ nel topo N3-ICtg rispetto al WT (35,6%±8,7% vs 6,0%±3,1%) (**FIG.23A**), indicando il loro aumento prima dello sviluppo della malattia. Nella sottopopolazione dei timociti DP, le cellule CD4⁺CD8⁺Notch3⁺CXCR4⁺ aumentano notevolmente nel topo transgenico a 6-8 settimane (66,5%±11,3%) (**FIG.23B**) rispetto al WT.

È da notare che le poche cellule DP Notch3⁺CXCR4⁻ nel topo N3-ICtg suggeriscono che il segnale di Notch3 indirizzi i timociti DP a diventare Notch3⁺CXCR4⁺ come sostenuto dal loro numero assoluto, fortemente aumentato nei timociti N3-ICtg rispetto al WT (**FIG.23D**). Abbiamo quindi confrontato il numero assoluto di CD4⁺CD8⁺ che esprimono solo uno o entrambi i recettori normalizzato sul numero totale di timociti DP (rispettivamente Notch3⁻CXCR4⁺ Notch3⁺CXCR4⁺) in topi di 3 settimane di età fino a quelli più vecchi di 12-14 settimane. Il timo dei topi transgenici a 3 settimane mostra una significativa espansione delle cellule CD4⁺CD8⁺Notch3⁺CXCR4⁺, le quali aumentano ulteriormente a 6-8 settimane fino a raggiungere un "plateau" a 12-14 settimane (**FIG.23C**).

I nostri dati indicano che il timo del topo N3-ICtg, rispetto al WT, è progressivamente più popolato da specifiche cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺.

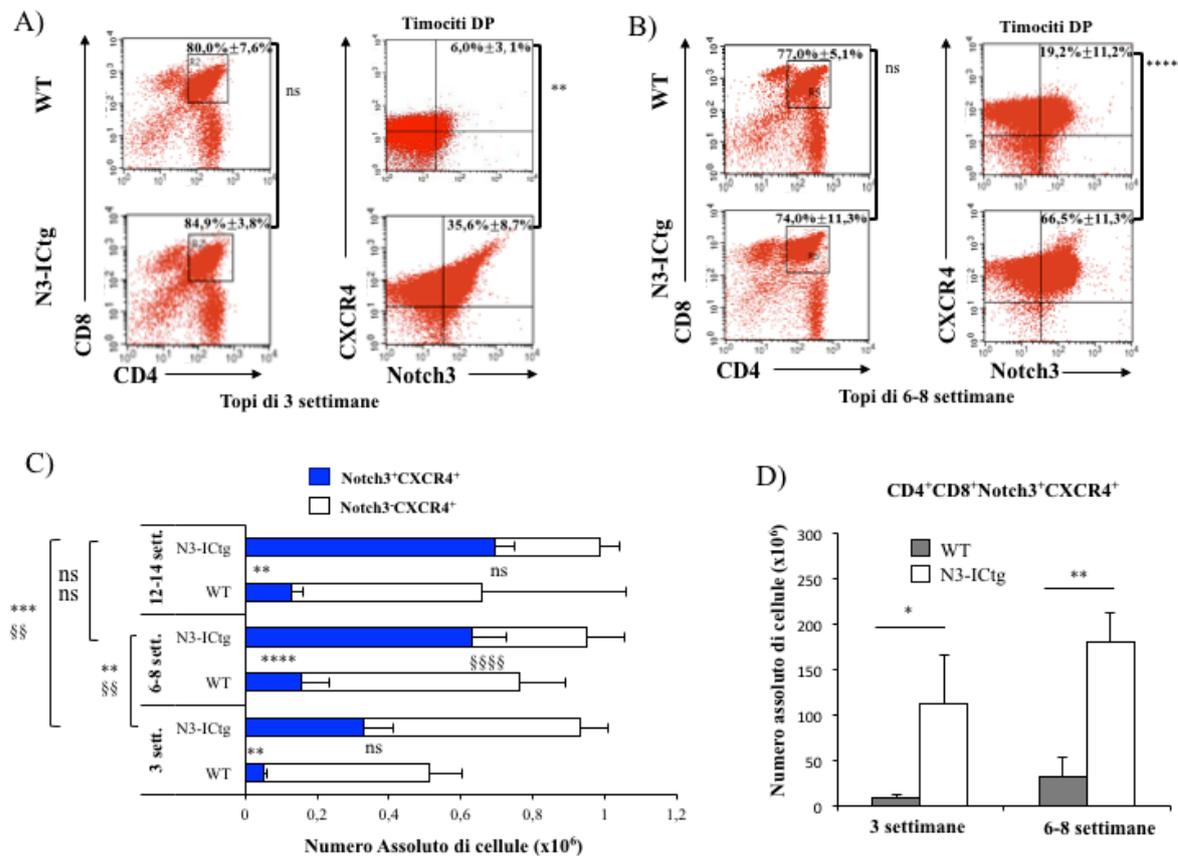


FIG.23: L'elevata e combinata espressione in superficie di Notch3⁺CXCR4⁺ caratterizza gli stadi precoci dei timociti DP. A) Analisi citofluorimetrica di timociti ottenuti *ex vivo* da topi di 3 settimane WT e N3-ICtg (n=4). A sinistra sono indicate la distribuzione dei timociti e la percentuale ± SD dei timociti CD4⁺CD8⁺; a destra è mostrata la percentuale ± SD delle cellule Notch3⁺CXCR4⁺ DP. B) Analisi citofluorimetrica di timociti ottenuti *ex vivo* da topi di 6-8 settimane WT e N3-ICtg (n=7). A sinistra sono indicate la distribuzione dei timociti e la percentuale ± SD dei timociti CD4⁺CD8⁺; a destra è mostrata la percentuale ± SD delle cellule Notch3⁺CXCR4⁺ DP. C) Numeri assoluti delle cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺ e/o Notch3⁻CXCR4⁺ normalizzati sul numero dei timociti DP totali. T-test tra WT e N3-ICtg ad ogni età. Il simbolo § e * indicano Notch3⁻CXCR4⁺ and Notch3⁺CXCR4⁺, rispettivamente. Ad ogni età sono stati utilizzati n=5 topi per ogni genotipo. One-way ANOVA e Tukey's post-test (nella parte sinistra) è stato utilizzato tra i topi N3-ICtg di diverse età (ns, not significant, **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001; §§§§p < 0.0001; §§p < 0.01). D) Numero assoluto delle cellule CD4⁺CD8⁺ Notch3⁺CXCR4⁺ nel topo transgenico N3-ICtg e nel WT (n=3) (*p < 0.05; **p < 0.01).

Anomala circolazione di cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺ precocemente presenti nel sangue di topi N3-ICtg

In modelli preclinici di leucemie indotte da Notch, è stato dimostrato che cellule T CD4⁺CD8⁺ infiltrano gli organi linfoidi periferici (Bellavia et al., 2000; Pear et al., 1996; Campese et al., 2006). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che la delezione di Pin1 previene la progressione della leucemia, riducendo l'espressione di Notch3 e bloccando l'espansione e l'invasività delle cellule T CD4⁺CD8⁺ circolanti nel topo N3-ICtg (Franciosa G. et al., 2016). Dato l'incremento competitivo delle DP Notch3⁺CXCR4 nel timo del topo transgenico a 3 settimane (**FIG.23A**) e la nozione che la fuoriuscita delle cellule T singole positive sia legata al recettore CXCR4, abbiamo analizzato l'immunofenotipo delle cellule CD4⁺CD8⁺ circolanti nel sangue (**FIG.24A**). Prima dell'insorgenza della patologia il sangue dei topi transgenici è privi di cellule T CD4⁺CD8⁺ (0.5%±0,1%) in confronto con il WT (0.3%±0,2%) (**FIG.24A**, pannelli a sinistra). Di conseguenza le cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺ sono irrilevabili (**FIG.24A**, pannelli a destra). Al contrario a 6-8 settimane (**FIG.24B**, pannello superiore), abbiamo trovato cellule CD4⁺CD8⁺ nel sangue dei topi N3-ICtg (4.0%±1.0%), principalmente rappresentate da cellule DP Notch3^{high}CXCR4^{high} (74,4%±15,0%) che ricordano i timociti Notch3^{high}CXCR4^{high} DP del topo transgenico (**FIG.23B**). A 12-14 settimane, con il progredire della malattia (**FIG.24B**, pannello inferiore) osserviamo un incremento delle cellule T DP nel sangue (8,0%±4,0%), ancora rappresentate dalle CD4⁺CD8⁺Notch3⁺CXCR4⁺ (23,0%±4,6%), ma progressivamente rimpiazzate dalle cellule negative per entrambi i recettori CD4⁺CD8⁺Notch3^{-LOW}CXCR4⁻. Di conseguenza, le cellule CD4⁺CD8⁺Notch3^{high}CXCR4^{high} individuano le prime cellule T DP circolanti nel sangue del nostro modello di T-ALL.

Partendo dal rapporto tra le cellule T CD4⁺CD8⁺Notch3⁺CXCR4⁺ sulle CD4⁺CD8⁺Notch3⁻CXCR4⁺, osserviamo la massima presenza in circolo di cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺ nel sangue del topo transgenico a 6-8 settimane (**FIG.24C**), dove superano di gran lunga le DP Notch3⁻CXCR4⁺. Con il pieno sviluppo della patologia a 12-14 settimane, questo rapporto diminuisce (**FIG.24C**) in accordo con i dati mostrati nella (**FIG.24B**, pannelli inferiori).

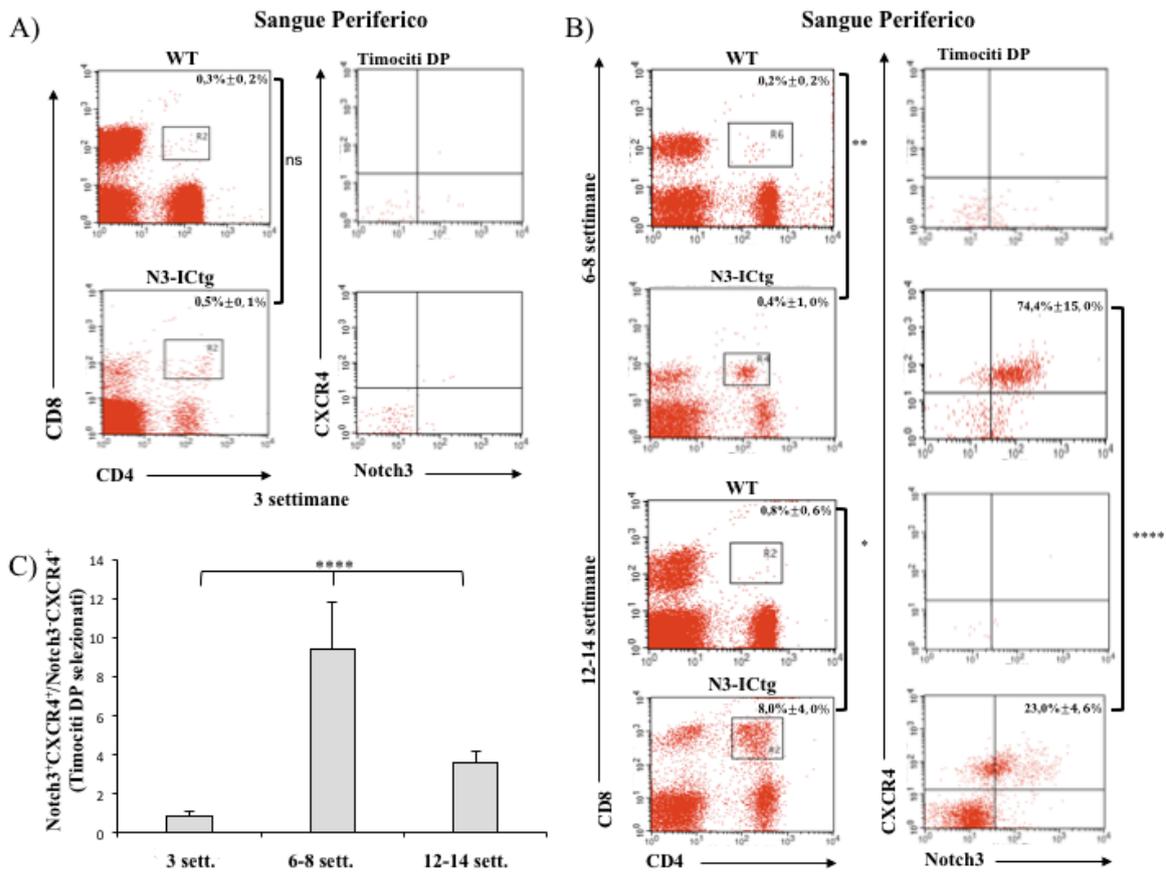


FIG.24: Le cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺ nel sangue circolante del topo N3-ICtg. A) Analisi citofluorimetrica della distribuzione delle sottopopolazioni CD4⁺CD8⁺ nel sangue di topi WT e N3-ICtg a 3 settimane (n=3). B) Pannello sinistro: grafici rappresentativi delle cellule T CD4⁺CD8⁺ circolanti nel sangue in topi WT e N3-ICtg di 6-8 e 12-14 settimane (n=4); pannello a destra: le cellule Notch3⁺CXCR4⁺ nella sottopopolazione di cellule DP selezionate. Nei grafici sono indicate le medie delle percentuali \pm SD. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante t-test C) Rapporto di percentuali tra cellule Notch3⁺CXCR4⁺ sulle cellule Notch3⁺CXCR4⁺ selezionate da cellule T DP circolanti nel topo N3-ICtg. Per ogni età almeno quattro topi sono stati analizzati. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante test ANOVA e Tukey's post-test (*p<0.05; **p<0.01; ****p < 0.0001; ns, not significant; One-way ANOVA-test).

L'onda delle cellule T Notch3⁺CXCR4⁺ DP invade progressivamente il midollo osseo del topo N3-ICtg.

È noto che l'espressione di CXCR4 facilita il traffico delle cellule T patogene al midollo osseo in un modello murino di Anemia Aplastica (Kuksin et al., 2015). Inoltre, lo stroma del midollo osseo in grado di produrre SDF-1 è necessario per il mantenimento delle cellule leucemiche nella progressione della T-ALL (Pitt et al., 2015).

Nell'analizzare l'infiltrazione del midollo osseo da parte di cellule T DP nel nostro modello di topo N3-ICtg, abbiamo inizialmente valutato le percentuali delle cellule T DP nel midollo osseo di topi di 3 settimane di età nel WT (0.2% ± 0.1%) e nel N3-ICtg (0.6% ± 0.4%), sostanzialmente le cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺ non erano rilevabili.

Con il progredire dell'età, abbiamo riscontrato una elevata percentuale di cellule T DP nel midollo osseo di topi N3-ICtg a 6-8 settimane (31,3% ± 12,8%) e a 12-14 settimane di età (34,4% ± 14,2%), rispetto a topi più giovani (0,6% ± 0,4%) (**FIG.25A**). Al contrario, come mostrato nella **FIG.25A**, cellule CD4⁺CD8⁺ non sono mai state ritrovate nel midollo osseo di topi WT di 6-8 e 10-12 settimane di età (0,5% ± 0,2% e 0,4% ± 0,3% rispettivamente). Mentre è evidente un aumento statisticamente significativo di cellule DP infiltranti il midollo osseo del topo N3-ICtg a diverse età (**FIG.25B**). Queste DP sono principalmente composte da cellule T Notch3⁺CXCR4⁺ precisamente il 61,4%±14,2% a 6-8 settimane con un "plateau" a 12-14 settimane (57.9% ±15.4%) nei topi N3-ICtg. Date le alte percentuali riscontrate, ipotizziamo che questa popolazione colonizzi e proliferi facilmente nel midollo osseo; abbiamo poi confrontato il numero assoluto delle cellule T Notch3⁺CXCR4⁺ DP e Notch3⁻CXCR4⁺ DP normalizzato sul numero totale delle cellule T DP, osservando che il numero delle cellule T Notch3⁺CXCR4⁺ DP raggiunge un picco a 6-8 settimane, per poi rimanere invariato a 12-14 settimane nei topi N3-ICtg (**FIG.25C**). Al contrario, le cellule Notch3⁻CXCR4⁺ DP non cambiano mai (**FIG.25C**). È interessante notare come i nostri risultati mettano in luce una localizzazione ed espansione preferenziale delle cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺ nel midollo osseo dei topi transgenici.

L'associazione di CXCR4 con metastatizzazione sito-specifica, nel midollo osseo nei pazienti affetti da neuroblastoma (Geminder et al., 2001; Ben Baruch et al., 2009), ed il ruolo della nicchia endoteliale nel mantenimento Notch-dipendente delle cellule T-ALL (Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015), favoriscono ulteriormente la nostra ipotesi che il crosstalk fra Notch3 e CXCR4 possa indirizzare le cellule "pre-leucemiche" verso il midollo osseo.

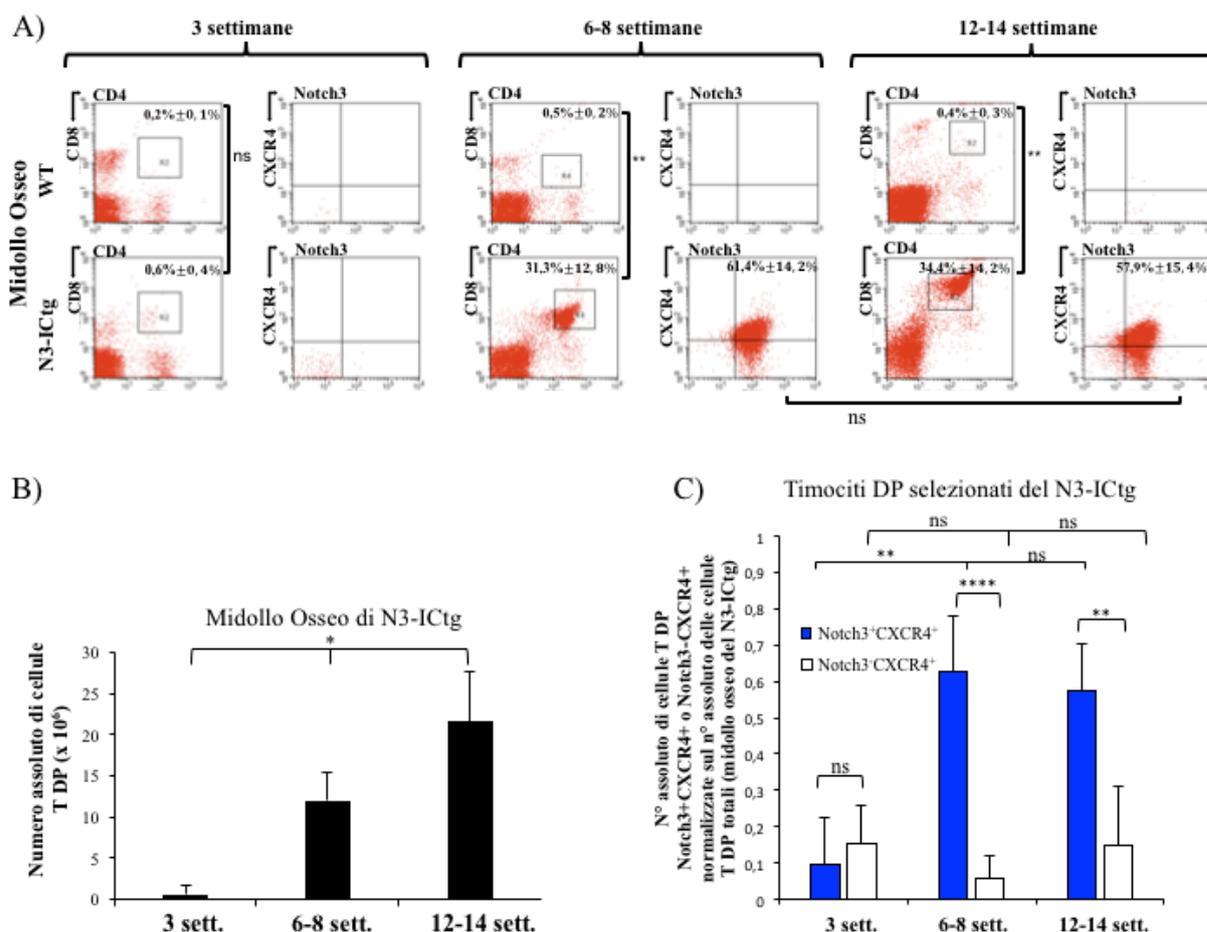


FIG.25: Le cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺ invadono progressivamente il midollo osseo del topo N3-ICtg. A) Analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni delle cellule T nel midollo osseo di topi WT e N3-ICtg di 3, 6-8 e 12-14 settimane di età (pannelli a sinistra) e analisi citofluorimetrica delle cellule T DP per l'espressione combinata dei recettori Notch3⁺CXCR4⁺ (pannelli a destra). In ogni grafico sono riportate le percentuali medie ±SD (n=6). L'analisi statistica è stata eseguita tramite t-test (**p<0.01; ns, not significant). B) Il numero assoluto di cellule T DP infiltranti il midollo osseo del topo transgenico N3-ICtg (n=6). L'analisi statistica è stata eseguita con test ANOVA (*p < 0.05, one-way ANOVA test) C) Numero assoluto delle cellule Notch3⁺CXCR4⁺ e/o Notch3⁻CXCR4⁺ normalizzato sul numero assoluto delle cellule T totali DP derivate dal midollo osseo del topo N3-ICtg (n=6). L'analisi statistica è stata eseguita tramite test ANOVA (**p < 0.01; ****p < 0.0001; ns, not significant, Tukey's post-test).

L'elevata co-espressione Notch3⁺CXCR4⁺ facilita "homing" ed "engraftment" di timociti DP nel midollo osseo.

I risultati precedenti ci hanno spinto a voler comprendere se i timociti Notch3⁺CXCR4⁺DP con elevata capacità di migrazione e a circolare in modo anomalo nel sangue dei topi N3-ICtg, potessero infiltrare il midollo osseo di topi riceventi immuno-compromessi (NSG). Timociti purificati da topi transgenici di 6-8 settimane, immunofenotipicamente distinti in Notch3^{high}CXCR4^{high} (N3^{high}) o Notch3^{low}CXCR4^{high} (N3^{low}) (**FIG.26**) sono stati rispettivamente iniettati nella vena caudale (iv) di topi riceventi NSG. La differenza delle cellule N3^{high} e N3^{low} nel raggiungere (homing-giorno1) e nell'attecchire (engraftment-giorno 10) il midollo osseo dei topi NSG è stata valutata con analisi citofluorimetrica. Dieci giorni dopo l'iniezione delle cellule N3^{high}, il midollo osseo dei topi riceventi mostrava un'elevata percentuale di cellule T DP (6,95%), composte per lo più da cellule CD4⁺CD8⁺Notch3^{high}CXCR4^{high} (89,7%) (**FIG.27A**, pannelli superiori). Al contrario, i topi iniettati con le cellule N3^{low} presentavano solo lo 0,1% di cellule DP, essenzialmente prive in superficie dei due recettori (**FIG.27A**, pannelli inferiori). Valutando il numero delle DP nel midollo osseo dei topi iniettati con cellule N3^{high} (**FIG.27B**), è evidente la loro migliore capacità di raggiungere la nicchia midollare nei topi NSG. Già al giorno 1 dopo l'iniezione, il numero delle cellule T DP è più alto nei topi iniettati con le N3^{high} in confronto con i topi iniettati con le cellule T DP N3^{low}. Al giorno 1, in effetti, le cellule T DP N3^{low} non raggiungono il midollo osseo dei topi NSG (**FIG.27B**). Al giorno 10, dimostriamo che le cellule T DP N3^{high} sono in grado di attecchire il midollo osseo dei topi riceventi NSG, e confrontando il numero delle DP ricavate dal midollo osseo dei topi NSG si vede che le N3^{high} sono molto di più al giorno 10 rispetto alle N3^{low} (**FIG.27B**).

Tale differenza può essere anche visualizzata attraverso l'aumento del rapporto tra il numero delle cellule DP recuperate dai topi N3^{high} su quelle dei N3^{low} a 10 giorni (**FIG.27B**, grafico in basso). Ciò conferma come i timociti caratterizzati dall'alta espressione del recettore Notch3 già dopo un giorno dall'iniezione sono capaci d'invadere il midollo osseo e di colonizzarlo, con una evidente espansione a 10 giorni. Abbiamo ipotizzato che tale maggiore idoneità sia dovuta ad una maggiore responsività delle cellule N3^{high} al fattore SDF-1, prodotto in grandi quantità dal microambiente del midollo osseo. A sostegno della diversa responsività al ligando, 24 ore dopo il trattamento con SDF-1 abbiamo osservato una significativa riduzione della percentuale di cellule positive all'AnnexinaV nella sottopopolazione di timociti DP N3^{high}, rispetto alle cellule di controllo trattate con il solo PBS. Al contrario, le DP N3^{low} si dimostrano quasi non-

responsive al trattamento con SDF-1 (**FIG.27C**). Ipotizziamo che l'iperespressione di Notch3 consenta un migliore insediamento potenziando la responsività a SDF-1 e favorendo programmi di sopravvivenza mediati da CXCR4. Abbiamo seguito la propagazione dei timociti purificati anche nella milza. Dopo un giorno, le cellule DP N3^{high} invadono la milza e si espandono dopo 10 giorni, al contrario di quanto accade per le N3^{low} (**FIG.27D**). Di conseguenza, il rapporto tra il numero delle cellule DP N3^{high} su quelle dei N3^{low} (N3^{high}/N3^{low}) aumenta, sostenendo la migliore competenza delle cellule DP N3^{high} ad infiltrarsi sia nella milza che nel midollo osseo dei topi NSG (**FIG.27D**, pannello in basso). È interessante notare che i timociti DP N3^{high} e N3^{low} mostrano un diverso tasso di proliferazione. *In vivo* marcatura con la Bromodeossiuridina (BrdU) dimostra che le cellule DP N3^{high} hanno un tasso di proliferazione aumentato (**FIG.28A e B**). Inoltre, i timociti DP N3^{high} hanno un'espressione di Ki67 più elevata rispetto ai timociti DP N3^{low}, come confermato da un valore di MFI superiore per Ki67 (**FIG.28C**).

Nel complesso, i nostri risultati dimostrano che la combinata espressione di Notch3 e di CXCR4 potenzia la diffusione di cellule DP N3^{high} verso il midollo osseo e la milza in risposta al fattore chemiotattico SDF-1, dimostrando così la loro 'idoneità' nella propagazione e nell'espansione.

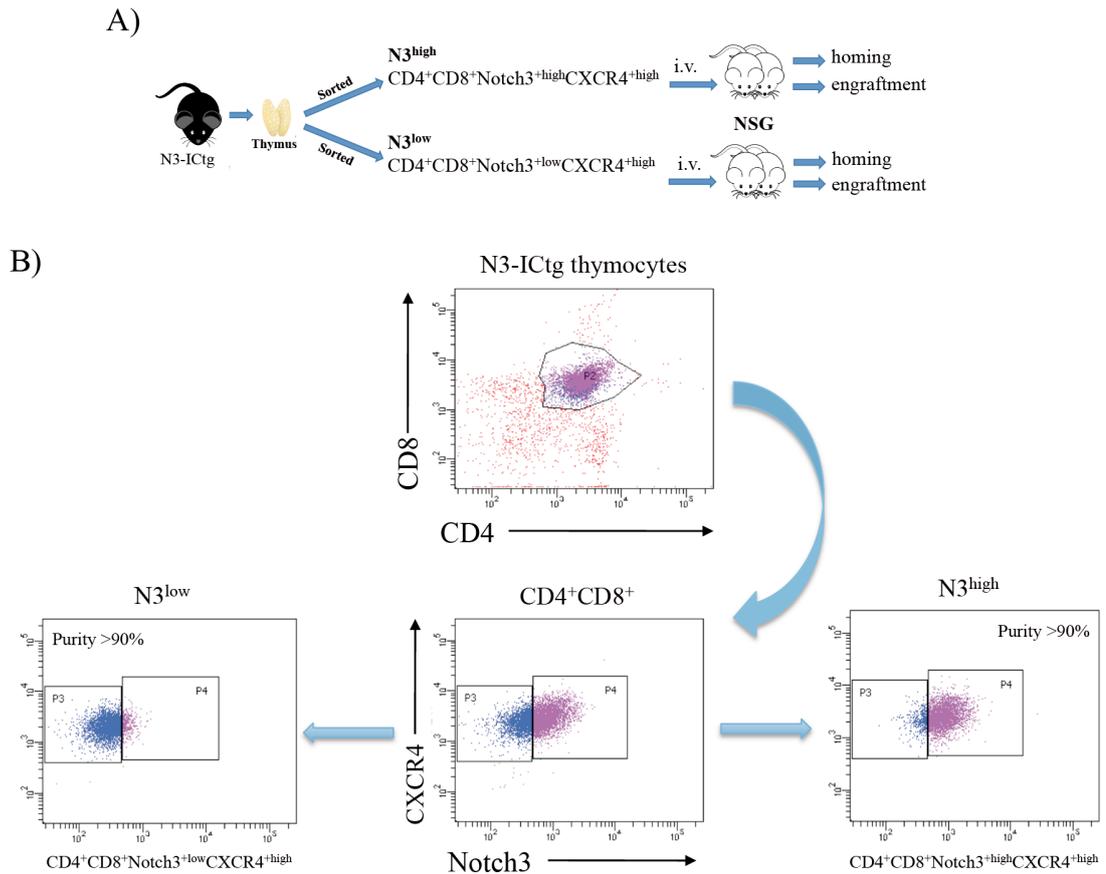


FIG.26: Strategia di selezione delle cellule DP $N3^{high}$ e $N3^{low}$ dal timo di un topo N3-ICtg. *In vivo* trasferimento di queste cellule in topi riceventi immunocompromessi NSG. A) Rappresentazione schematic dell'esperimento. Timociti sortati $CD4^+CD8^+Notch3^{+high}CXCR4^{+high}$ ($N3^{high}$) oppure $CD4^+CD8^+Notch3^{+low}CXCR4^{+high}$ ($N3^{low}$) provenienti da un topo N3-ICtg di 8 settimane di età sono stati iniettati nella vena caudale di topi NSG (circa $2,5 \times 10^6$ cellule sono state iniettate). Dopo l'iniezione è stata effettuata analisi citofluorimetrica per le cellule del midollo osseo e della milza dei topi NSG. Dopo 1giorno per valutare la capacità di 'homing' delle cellule mentre dopo 10giorni per valutare la loro capacità di 'engraftment'. B) Nella figura è illustrata la strategia di sorting effettuata con il FACS Aria sorter per selezionare i timociti $N3^{high}$ e $N3^{low}$. La purezza delle cellule T selezionate è $> 90\%$.

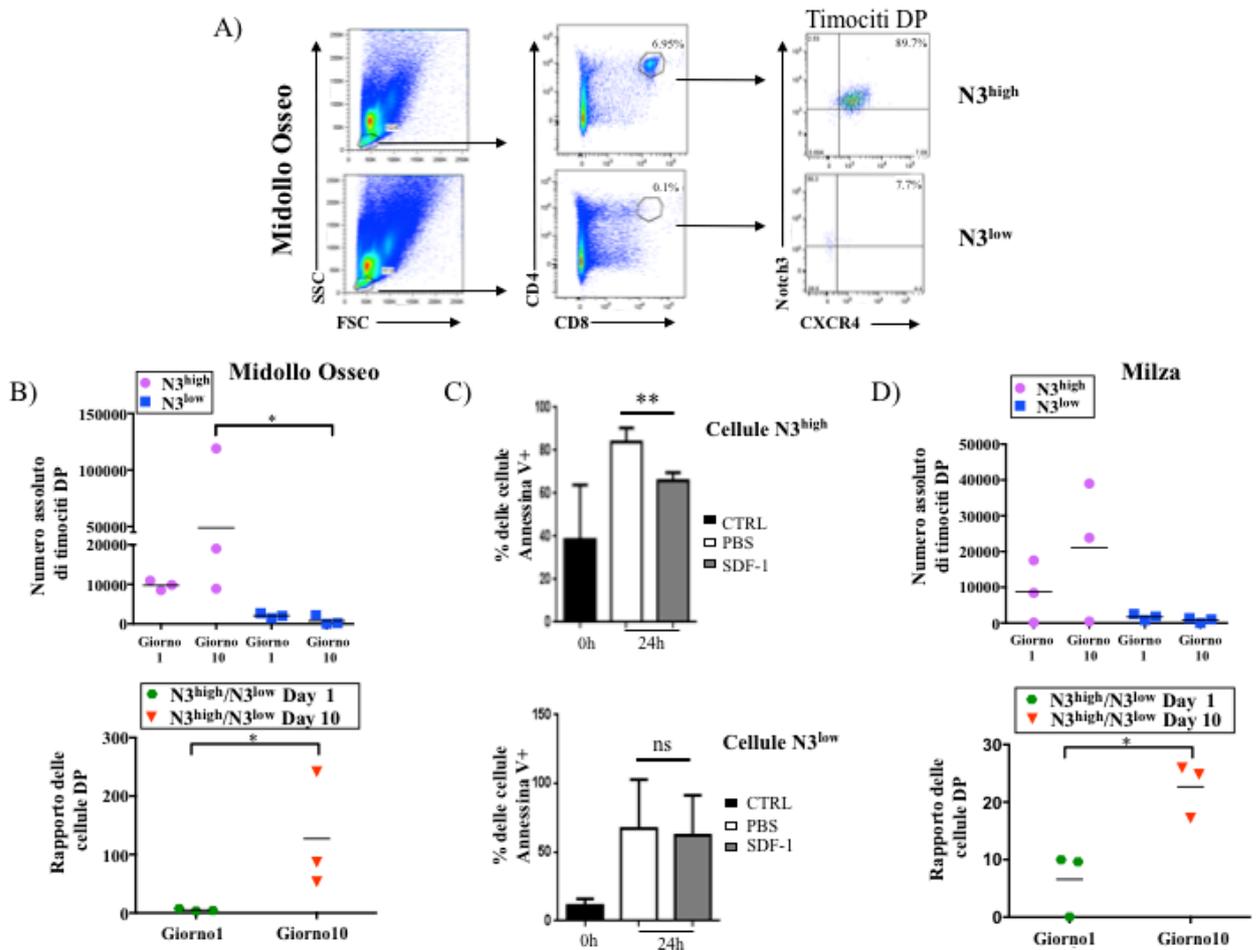


FIG.27: “Homing” ed “Engraftment” di timociti DP derivanti dal topo N3-ICtg ed esperimenti elevati livelli di CXCR4 e Notch3. A) Analisi al FACS dell’engraftment di timociti N3^{high} e/o N3^{low} nel midollo osseo 10 giorni dopo l’iniezione endovenosa (i.v.). I numeri nei grafici indicano le percentuali delle cellule T DP (pannelli centrali) e delle cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺ (pannelli a destra). B) I grafici rappresentano i numeri di cellule DP infiltranti il midollo osseo dei topi NSG dopo l’iniezione endovenosa delle cellule N3^{high} (cerchio viola) e / o N3^{low} (quadrato blu; grafico superiore) e il rapporto tra le cellule T DP N3^{high}/N3^{low} dopo 1 giorno (esagono verde) ed a 10 giorni (triangolo rosso) (grafico inferiore). C) Valutazione *ex vivo* dell’apoptosi nei timociti DP N3^{high} (grafico superiore) e N3^{low} (grafico inferiore) dopo 24h di trattamento con SDF-1 rispetto al trattamento con PBS. I dati sono rappresentati come valore medio ± SD. D) I grafici rappresentano il numero di cellule T DP rilevate nella milza dopo l’iniezione endovenosa delle DP N3^{high} (cerchio viola) e N3^{low} (quadrato blu; grafico superiore) e il rapporto delle cellule T DP N3^{high} / N3^{low} (grafico inferiore) a 1 giorno (esagono verde) ed a 10 giorni (triangolo rosso) dall’iniezione.

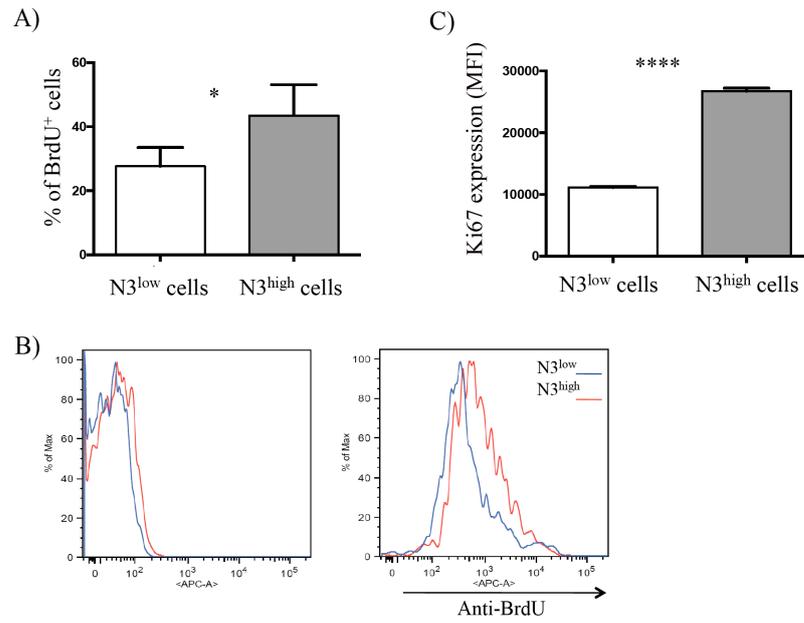


FIG.28: Analisi del tasso proliferativo *in vivo* e *ex vivo* dei timociti DP N3^{high} e N3^{low} del topo N3-ICtg. A) Colorazione *in vivo* con BrdU dei timociti DP N3^{high} e N3^{low} di un topo N3-ICtg di 8 settimane. 24 ore dopo l'iniezione è stata valutata la percentuale delle cellule positive per la BrdU al FACSCantoII. L'analisi statistica è stata eseguita con t-test (*p<0.05). B) Analisi citofluorimetrica con anti-BrdU dei timociti DP N3^{high} (linea rossa) e N3^{low} (linea blu). C) Colorazione *ex vivo* intracellulare per il Ki67 dei timociti isolati dal topo N3-ICtg di 8 settimane. Nel grafico è riportata la Mean Fluorescence Intensity (MFI). L'analisi statistica è stata eseguita con t-test (****p<0.0001).

Antagonismo farmacologico in vivo del recettore di CXCR4 riduce l'infiltrazione delle cellule T che sovraesprimono Notch3 nel midollo osseo.

AMD3100 è un antagonista del recettore di CXCR4 molto specifico ed efficace. È stato utilizzato per la mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche, nonché per il trattamento della leucemia mieloide e dei tumori solidi (Liu et al., 2015). Per studiare l'effetto dell'antagonismo di CXCR4 nella propagazione anomala delle cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺, abbiamo eseguito una somministrazione intraperitoneale (IP) giornaliera con AMD3100 in topi N3-ICtg di 3-4 settimane, cioè poco prima che si verifichi la colonizzazione del midollo osseo. Dopo dieci giorni abbiamo valutato il numero delle cellule T DP nel midollo osseo mediante citofluorimetria, come mostrato nella figura **FIG.29**. Le cellule T DP totali in grado di infiltrare il midollo osseo sono notevolmente ridotte dopo la somministrazione di AMD3100, rispetto ai topi iniettati con PBS (**FIG.29A**). È interessante notare che le cellule T DP infiltranti sono per lo più composte da Notch3⁺CXCR4⁺, che sono significativamente diminuite nei topi trattati con AMD3100 rispetto ai topi iniettati con PBS (**FIG.29B**). In particolare, questi risultati dimostrano che l'antagonismo farmacologico di CXCR4 *in vivo* può ridurre drasticamente l'infiltrazione e l'attecchimento del midollo osseo da parte delle cellule DP "pre-leucemiche". Pertanto, questo trattamento può avere implicazioni significative per un potenziale approccio terapeutico.

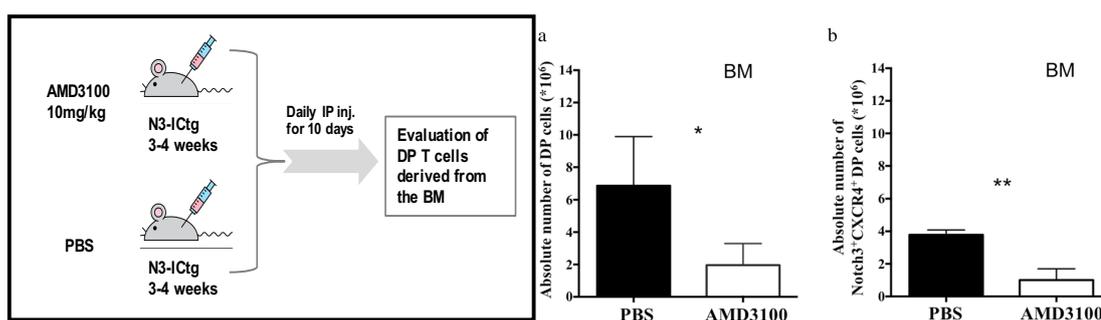


FIG.29: Antagonismo farmacologico *in vivo* del recettore CXCR4. L'antagonismo contrasta l'anomala infiltrazione delle cellule T DP nel midollo osseo di topi N3-ICtg. Topi N3-ICtg di 3-4 settimane hanno ricevuto una somministrazione giornaliera di PBS o di AMD3100, l'antagonista del recettore CXCR4. A) Il grafico mostra il numero assoluto delle cellule T DP al giorno 10 dopo l'iniezione. B) Il grafico mostra il numero assoluto delle cellule T DP Notch3⁺CXCR4⁺ al giorno 10 dopo l'iniezione. In ogni grafico sono riportate le percentuali medie \pm SD. (*p < 0.05; **p < 0.01; Student's t-test).

Notch3 regola l'espressione in superficie di CXCR4 modulando la β -arrestina1.

Per comprendere il meccanismo molecolare attraverso il quale Notch3 regola l'espressione in superficie di CXCR4 abbiamo modulato la sua funzione in una linea cellulare umana di leucemia linfoblastica acuta a cellule T: le TALL-1 caratterizzate dall'espressione di CD4, CD8, CD3, mutazioni attivanti di Notch3 ed alta espressione in superficie di CXCR4. Abbiamo, quindi, specificamente silenziato il gene Notch3 in questa linea cellulare (shNotch3) e mediante FACS abbiamo monitorato l'espressione in superficie di CXCR4 in tali cellule (**FIG.30A**).

Come già menzionato, i livelli di CXCR4 come mRNA tra WT e N3-ICtg non cambiano nelle cellule DP (**FIG.22B**); in accordo con i nostri dati, nella linea cellulare TALL-1 non è stata riportata una regolazione trascrizionale Notch-indotta del CXCR4 (Mirandola et al., 2012). I nostri dati dimostrano che lo spegnimento *in vitro* di Notch3 nella linea cellulare TALL-1 abbassa l'espressione di CXCR4 in superficie (**FIG.30A**), e diminuisce la loro capacità migratoria in risposta al SDF-1 (**FIG.30B**).

Per l'internalizzazione del recettore CXCR4 è necessaria l'attività della β -arrestina (Marchese et al., 2013; Puca et al., 2014); la β -arrestina media anche l'internalizzazione dei recettori β -adrenergici dove l'attività delle ERK possono avere un controllo inibitorio su di essa (Lin et al., 1999). La fosforilazione e defosforilazione sul residuo Ser-412 regola selettivamente la funzione di endocitosi ma non la funzione di desensibilizzazione della β -arrestina (Lin et al., 1999). Nei nostri esperimenti, le cellule silenziate per Notch3 mostrano rispetto al controllo una diminuzione dei livelli di fosforilazione della Serina 412 sulla β -arrestina1 (indicata come p- β -arrestin1 nella **FIG.30C**, pannello a sinistra). Questi risultati correlano con una diminuzione dei livelli di fosforilazione della phospho-Erk kinasi nelle TALL-1 silenziate per Notch3 (dati non mostrati) che sono in accordo con il potenziamento del signaling delle Erk nei timociti DP/CD8⁺ del topo N3-ICtg riportato in Talora et al., 2003 e Tallora et al., 2006. Come controprova in estratti proteici totali di timociti da topi transgenici N3-ICtg di 6-8 settimane, abbiamo osservato un alto livello di fosforilazione della Serina 412 sulla β -arrestina rispetto ai WT (**FIG.30C**, pannello a destra). Per studiare meglio il ruolo della β -arrestina1 nel mediare l'effetto di Notch3 sull'espressione di CXCR4, abbiamo utilizzato un mutante di β -arrestina1 che mima la sua forma fosforilata Ser412 \rightarrow Asp (S412D) e agisce come dominante negativo, inibendo lo sequestro e l'internalizzazione del recettore (Luttrell et al., 1999). Per raggiungere il nostro obiettivo, abbiamo effettuato una trasfezione transitoria nella linea cellulare Hek293 con la forma attiva di Notch3-IC insieme con la β -arrestina1-*wt* oppure con il mutante fosforilato

(β -arrestina1-S412D). Come mostrato nella **FIG.30D**, abbiamo osservato che in presenza della forma attiva di Notch3, il mutante della β -arrestina1 fosforilato (β -arrestina1-S412D) potenzia l'espressione di CXCR4 in superficie rispetto alla forma della β -arrestina1-*wt*. I nostri risultati quindi dimostrano che Notch3 è in grado di sostenere i livelli di fosforilazione della Serina 412 sulla β -arrestina1 (p- β -arrestin1), e che la p- β -arrestina1 cooperandosi con Notch3 mantiene in superficie CXCR4.

Il silenziamento di Notch3 nelle TALL-1 (shNotch3) riduce, inoltre, i livelli nucleari di β -arrestina1 rispetto alle cellule di controllo (**FIG.30E**, pannelli a sinistra). Successivamente, con estratti frazionati di timociti DP/CD8⁺ selezionati, dimostriamo che la β -arrestina1 aumenta nel nucleo, ma diminuisce nel citoplasma dei topi transgenici (**FIG.30E**, pannelli a destra), risultati che ulteriormente supportano la sua 'incapacità' di internalizzare il recettore CXCR4. Quindi, i nostri risultati permettono di correlare l'iperespressione di Notch3 alla funzione e alla localizzazione della β -arrestina1, come possibile mediatore dell'internalizzazione di CXCR4.

Inoltre, abbiamo effettuato l'analisi densitometrica che dimostra che la diminuzione della proteina β -arrestina1 nei timociti dei topi transgenici N3-ICtg rispetto ai WT è significativa (**FIG.30F**). Siccome c'è questa diminuzione, che potrebbe supportare ulteriormente il ruolo di Notch3 nel regolare l'espressione di CXCR4 per investigare un possibile significato traslazionale della correlazione tra il recettore CXCR4 e la β -arrestina1 abbiamo effettuato una *in silico* analisi dell'espressione genica di CXCR4 e β -arrestina1 in una coorte di 117 pazienti pediatrici di T-ALL (Homminga et al., 2011). È interessante notare che abbiamo trovato una significativa correlazione inversa nell'espressione genica tra CXCR4 e β -arrestina1 nei pazienti (**FIG.31A e B**).

In conclusione è illustrato il meccanismo tramite il quale β -arrestina1 media l'internalizzazione del recettore CXCR4 (**FIG.32A**), e il meccanismo con il quale Notch3 mantiene CXCR4 in superficie nelle cellule DP del topo N3-ICtg modulando la β -arrestina1 (**FIG.32B**).

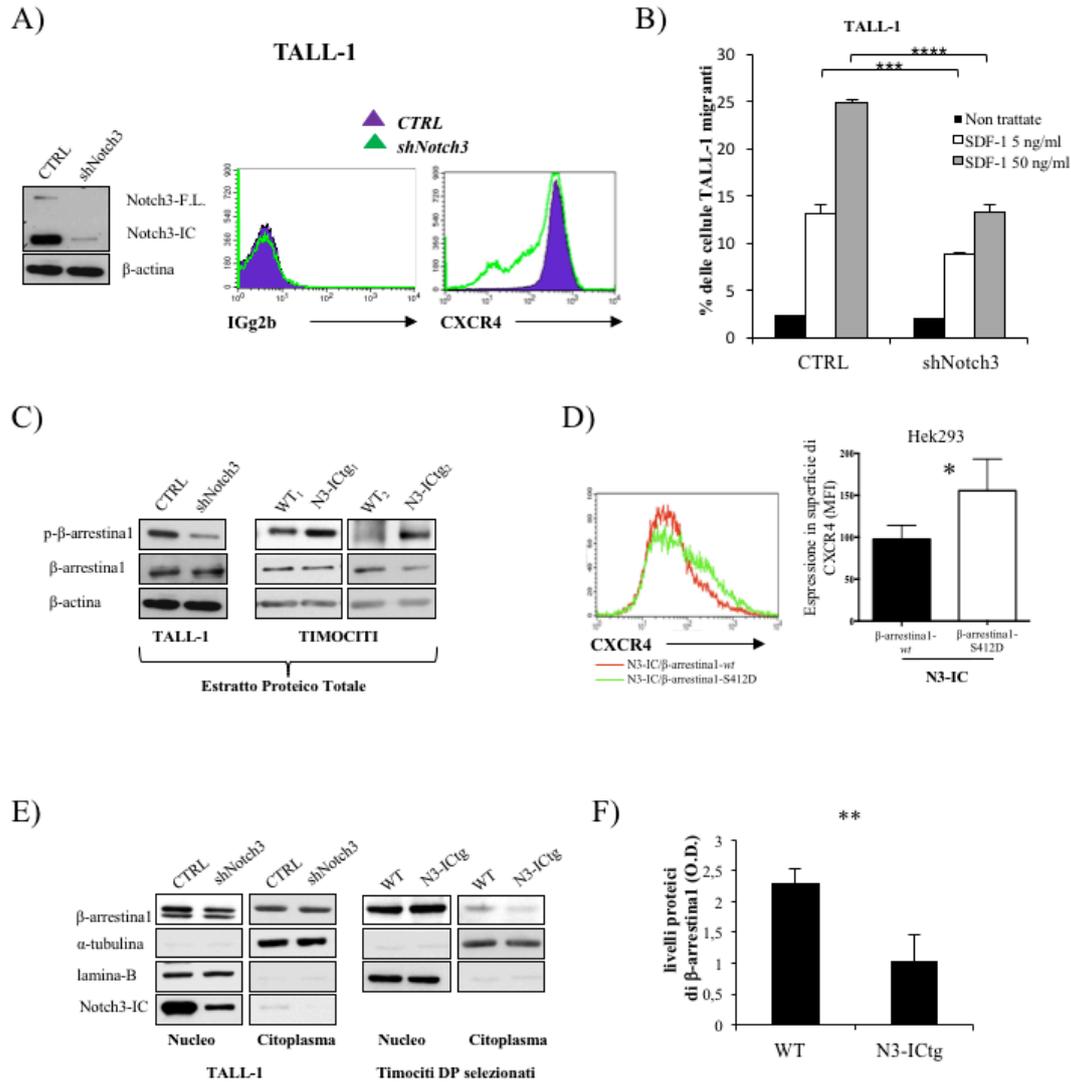


FIG.30: Notch3 regola l'espressione in superficie di CXCR4 modulando la β -arrestina1.

A) A sinistra: Analisi con western blot dei livelli della proteina di Notch3, nelle TALL-1 di controllo (CTRL) e silenziate per Notch3 (shNotch3). A destra: Analisi citofluorimetrica per l'espressione in superficie di CXCR4 nelle TALL-1 silenziate (shNotch3) rispetto al controllo (CTRL). B) Test di migrazione *in vitro* delle TALL-1 di controllo (CTRL) o silenziate per Notch3 (shNotch3) in presenza o in assenza di due diverse concentrazioni di SDF-1 (5 e 50 ng/ml). (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$, Student's t-test) C) A sinistra: Analisi dei livelli della beta-arrestina fosforilata (p- β -arrestina1) e non (β -arrestina1) tramite western blot su estratto proteico totale di cellule TALL-1 silenziate e non. A destra: Analisi dei livelli della beta-arrestina fosforilata (p- β -arrestina1) e non (β -arrestina1) tramite western blot su estratti proteici totali di timociti di due topi WT (WT_{1,2}) e due topi N3-ICtg (N3-ICtg_{1,2}). D) Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CXCR4 (MFI) nelle Hek293 trasfettate in modo transiente o con N3-IC (0,7 μ g) e β -arrestina1-*wt* (1,4 μ g) oppure con N3-IC (0,7 μ g) e β -arrestina1-S412D (1,4 μ g). (* $p < 0.05$, Student's t-test). E) A sinistra: Estratto frazionato (nucleo, citoplasma) di cellule TALL-1 CTRL e shNotch3 (silenziate per Notch3). A destra: Estratto frazionato (nucleo, citoplasma) di timociti DP/CD8⁺ di WT e di N3-ICtg. F) Densitometria dei livelli di β -arrestina1 nei timociti di topi WT rispetto ai N3-ICtg.

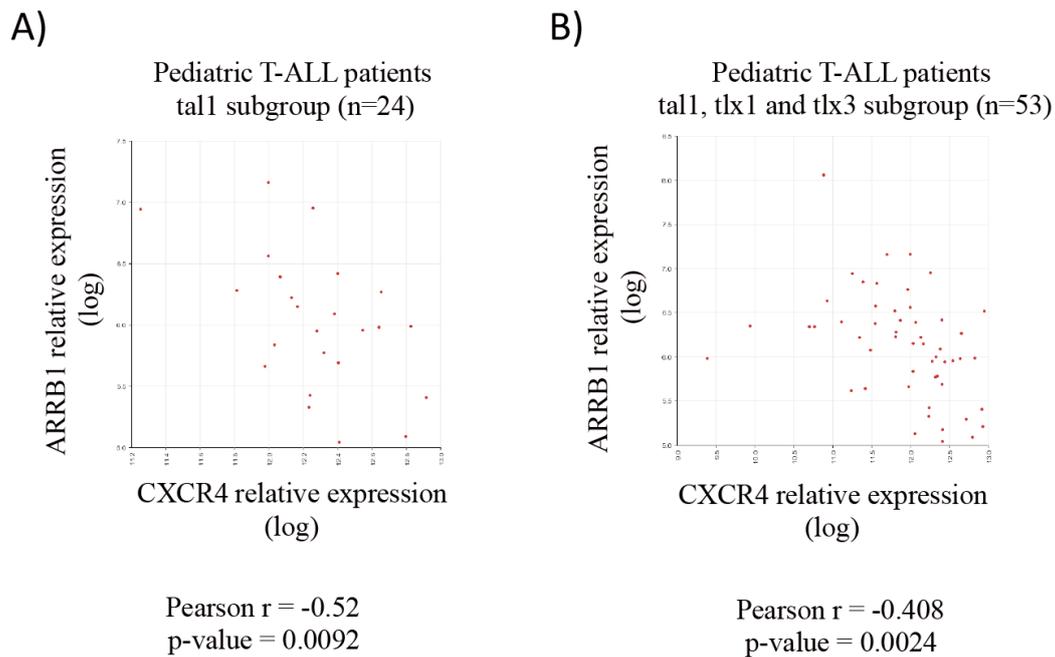
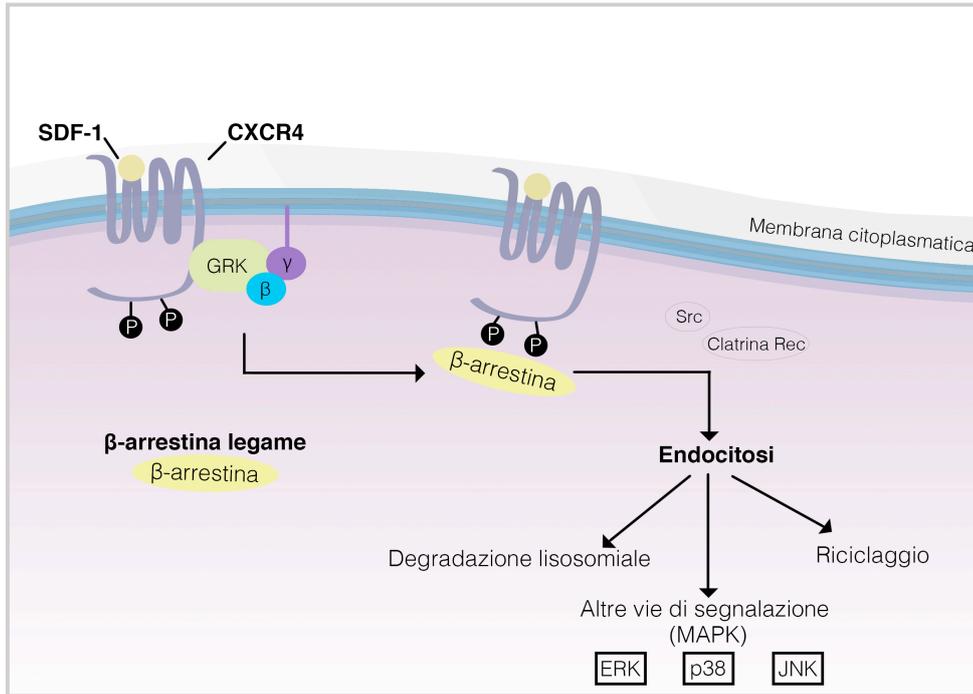


FIG.31: Livelli di CXCR4 e ARRB1 correlati in pazienti affetti da T-ALL.

I grafici mostrano la correlazione inversa tra i geni CXCR4 (CXCR4) e β -arrestina1 (ARRB1). I livelli di espressione genica sono stati ottenuti da una *in silico* analisi usando probe 217028_at e 222912_at per CXCR4 e ARRB1, rispettivamente, in una coorte di: A) 24 tal1 pazienti pediatrici affetti da T-ALL; e B) 53 (tal1, tlx1 and tlx3 sottogruppi) pazienti pediatrici affetti da T-ALL. In tutti i grafici (A-B) ogni dot corrisponde ad un paziente e i valori di espressione di CXCR4 e ARRB1 sono riportati in scala log₂, i dati sono normalizzati con l'algoritmo di normalizzazione "mas5.0 normalization algorithm". L'asse X-Y rappresentano i livelli di espressione di CXCR4 e ARRB1, rispettivamente. L'indice Pearson r esprime la relazione lineare tra i campioni, i valori p sono stati calcolati con il t-test.

A.



B.

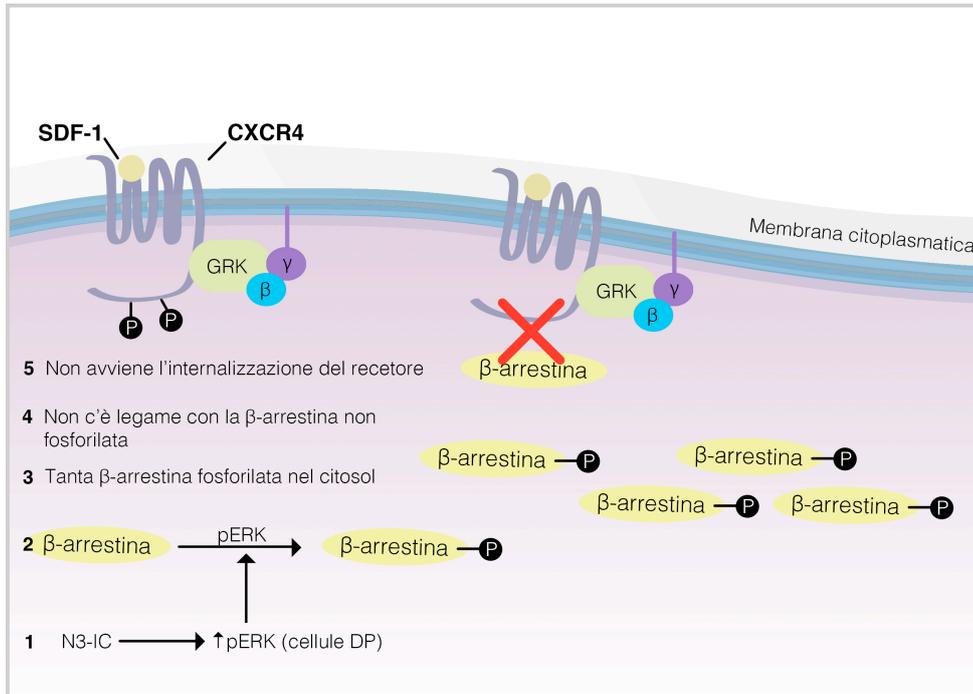


FIG.32: Illustrazione del meccanismo di internalizzazione del recettore di CXCR4 dalla β -arrestina1 (A) e del meccanismo di mantenimento del recettore di CXCR4 in superficie da Notch3 nei timociti DP del topo N3-ICtg (B). (Rappresentazione con Adobe Illustrator).

A) In presenza del ligando SDF-1, la chinasi GRK fosforila il recettore CXCR4, la β -arrestina1 non fosforilata viene reclutata e formando un complesso con Src and il recettore della clatrina induce l'internalizzazione del recettore tramite vescicole rivestite di clatrina. In seguito all'endocitosi il complesso può andare incontro a degradazione lisosomiale, a riciclaggio del recettore oppure inescare altre vie di segnalazione. B) Nei timociti DP del topo N3-ICtg i alti livelli del transgene causano un'elevata espressione di pERK. pERK è in grado di fosforilare la β -arrestina1 nel sito della Ser412 riducendo così la sua capacità di legarsi al Src e alla clatrina e di conseguenza di indurre l'internalizzazione del recettore di CXCR4. In questo modo l'overspressione di Notch3 mantiene in superficie il recettore CXCR4 nelle cellule DP del topo N3-ICtg.

CONCLUSIONI

Abbiamo caratterizzato la capacità di propagazione, homing e engraftment di cellule ‘pre-leucemiche’ Notch3⁺CXCR4⁺ DP nel nostro modello di leucemia Notch3-indotta.

In questo lavoro abbiamo riscontrato un’espansione progressiva e competitiva dei timociti CD4⁺CD8⁺ Notch3⁺CXCR4⁺ nel timo di topi transgenici Notch3 a 3 settimane con un picco a 6-8 settimane e il raggiungimento di un “plateau” a 12-14 settimane, il tutto correlato ad anomala propagazione di queste particolari DP nel sangue. L’aumentata espressione in superficie di CXCR4 sui timociti DP può interferire nelle relazioni tra le cellule T e lo stroma, inducendo non solo una maggiore migrazione dei primi, ma anche sottraendo le cellule Notch3⁺CXCR4⁺ al controllo del microambiente esterno. I nostri dati suggeriscono un meccanismo “timo-autonomo” legato alla ridotta capacità di SDF-1 a ritenere i timociti del topo transgenico, provocando la precoce presenza di cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺ nel sangue e nel midollo osseo del topo transgenico N3-ICtg di sei settimane. Questo potrebbe suggerire che l’espressione combinata di Notch3 e CXCR4 possa accelerare l’uscita di cellule immature T dal timo e potrebbe correlare con l’alterata architettura timica ed una diminuzione delle cellule T nel timo stesso, già descritte in Bellavia D. et al., 2000. Le cellule DP circolanti aumentano fino a 12-14 settimane, ma la loro composizione vira a livelli più bassi di cellule Notch3⁺CXCR4⁺, testimoniando la loro transitorietà nel sangue. L’alta co-espressione dei due recettori, Notch3⁺CXCR4⁺, potrebbe rappresentare il possibile marcatore identificativo per rilevare precocemente le cellule T DP circolanti in modo anomalo nel sangue del nostro modello di leucemia. Al contrario, a dodici settimane il midollo osseo dei topi transgenici è ancora densamente popolato da cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺, suggerendo che Notch3 favorisce la colonizzazione di quest’organo. Probabilmente, le cellule endoteliali vascolari che producono SDF-1 nella T-ALL creano un microambiente di supporto, che attrae e facilita l’espansione delle cellule DP Notch3⁺CXCR4⁺ (Pitt et al., 2015). Dal punto di vista molecolare, abbiamo dimostrato che Notch3 modula direttamente l’espressione in superficie di CXCR4 nelle TALL-1 umane tramite la β -arrestina1, la cui defosforilazione è necessaria per l’interazione β -arrestina/src, β -arrestina/clatrina e per l’endocitosi del recettore GPCR/CXCR4 (Lin et al., 1997; Hupfeld et al., 2005). Nei timociti N3-ICtg DP la funzione della β -arrestina1 è probabilmente inibita dall’elevato livello di fosforilazione nella serina 412, evento che potrebbe essere responsabile della maggiore traslocazione nucleare osservata di questo

adattatore. Insieme a dati precedentemente riportati (Passaro et al., 2015), che legano il riciclo di CXCR4 all'espressione calcineurina-dipendente della cortactina, ipotizziamo che l'iperfosforilazione di questo adattatore indotta da Notch3 possa sopprimere la funzione della β -arrestina1 e prevenire l'internalizzazione del recettore. Considerando che la β -arrestina può colocalizzare e legare la cortactina, non possiamo escludere una convergenza fra loro (Goertzen et al., 2016). Allo scopo di indagare la capacità di diffusione di questa specifica sottopopolazione di timociti Notch3^{high}CXCR4^{high} (N3^{high}) nei diversi organi linfoidi, abbiamo iniettato in vena queste cellule in topi immunocompromessi NSG e seguito la loro propagazione *in vivo*. I nostri risultati evidenziano che i timociti DP N3^{high} invadono il midollo osseo già dopo 1 giorno dall'iniezione. Tuttavia, l'alta espressione di CXCR4 da sola non è sufficiente a tale scopo, probabilmente è l'iperespressione di Notch3 che favorisce la migrazione SDF-1-mediata delle cellule N3^{high} al midollo osseo. Inoltre, l'aumento del numero di cellule N3^{high} e del rapporto delle cellule N3^{high}/N3^{low} che infiltrano la milza evidenziano il vantaggio delle cellule N3^{high} a propagare nei diversi organi linfoidi durante la progressione della leucemia. È stato riportato che le cellule leucemiche isolate di T-ALL vanno facilmente incontro ad apoptosi se non ricevono più stimoli da parte del microambiente, quali Notch e SDF-1 (Armstrong et al., 2009). Questi dati sottolineano la loro dipendenza e sono a sostegno dei nostri risultati che mostrano una riduzione dell'apoptosi delle cellule DP N3^{high} sotto trattamento con SDF-1. Inoltre, l'incapacità delle cellule T N3^{low} nel colonizzare il midollo osseo e la milza dopo 1 e 10 giorni dall'iniezione, sottolinea ulteriormente la necessità di un forte segnale di Notch per la persistenza in superficie di CXCR4 e la propagazione delle cellule leucemiche. L'antagonismo farmacologico con AMD3100 somministrata *in vivo* può contrastare l'infiltrazione delle DP nel midollo osseo dei topi N3-ICtg. Per concludere i nostri risultati evidenziano una nuova prospettiva futura sulla funzione di CXCR4 in combinazione con Notch3 nel mobilizzare le cellule T DP pre-leucemiche che si propagano velocemente, favorendo la progressione della T-ALL. Quindi, l'interazione Notch3/CXCR4 potrebbe suggerire nuove terapie combinate per bloccare precocemente la patologia in modo più efficace e selettivo, agendo sulle cellule pre-leucemiche, prevenendo la loro fuoriuscita dal timo e la loro disseminazione.

BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Murphy KM & Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*; 383:787-93.

Allman D, Karnell FG, Punt JA, Bakkour S, Xu L, Myung P, Koretzky GA, Pui JC, Aster JC and Pear SW (2001) Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* 194, 99-106.

Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Fujii N, Amagai T, and Nagasawa T. (2003). A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J. Immunol.*; 170:4649-55.

Armstrong F, de la Grange PB, Gerby B, Rouyez MC, Calvo J, Fontenay M, Boissel N, Dombret H, Baruchel A, Landman-Parker J, Roméo PH, Ballerini P, Pflumio F. (2009). NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* 2009; 113 (8): 1730-1740.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD and Lake R (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*; 284:770-76.

Aster JC, Robertson ES, Hasserjian RP, Turner JR, Kieff E, Sklar J. (1997). Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J Biol Chem*; 272:11336-343.

Aster JC, Xu L, Karnell FG, Patriub V, Pui JC and Pear WS. (2000). Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domain in induction of T-cell leukemia by Notch1. *Mol Cell Biol*; 20:7505-515.

Balkwill F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*; 4:540-50.

Barbarulo A, Grazioli P, Campese AF, Bellavia D, Di Mario G, Pelullo M, Ciuffetta A, Colantoni S, Vacca A, Frati L, Gulino A, Felli MP, Screpanti I. (2011). Notch3 and canonical NF-kappaB signaling pathways cooperatively regulate Foxp3 transcription. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6199-206. doi: 10.4049/jimmunol.1002136.

Bellavia D, Campese AF, Alesse E, Vacca A, Felli MP, Balestri A, Stoppacciaro A, Tiveron C, Tatangelo L, Giovarelli M, Gaetano C, Ruco L, Hoffman ES, Hayday AC, Lendhal U, Frati L, Gulino A and Screpanti I. (2000). Constitutive activation of NF- κ B and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J.*, 19:3337-48.

Bellavia D, Campese AF, Checquolo S, Balestri A, Biondi A, Cazzaniga G, Lendahl U, Fehling HJ, Hayday AC, Frati L, von Boehmer H, Gulino A and Screpanti I. (2002). Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 99:3788-93.

Bellavia D, Campese AF, Vacca A, Gulino A and Screpanti I. (2003). Notch3, another Notch in T cell development. *Semin. Immunol.*;15:107-12.

Ben-Baruch A. (2009). Site-specific metastasis formation: chemokines as regulators of tumor cell adhesion, motility and invasion. *Cell adhesion & migration* 2009; 3(4): 328-333.

Bernasconi-Elias P, Hu T, Jenkins D, Firestone B, Gans S, Kurth E, Capodieci P, Deplazes-Lauber J, Petropoulos K, Thiel P, Ponsel D, Hee Choi S, LeMotte P, London A, Goetschkes M, Nolin E, Jones MD, Slocum K, Kluk MJ, Weinstock DM, Christodoulou A, Weinberg O, Jaehrling J, Ettenberg SA, Buckler A, Blacklow SC, Aster JC, Fryer CJ. (2016). Characterization of activating mutations of NOTCH3 in T-cell acute lymphoblastic leukemia and anti-leukemic activity of NOTCH3 inhibitory antibodies. *Oncogene*. 2016;35(47):6077–6086. doi:10.1038/onc.2016.133.

Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*; 90(2):281-91.

Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, Bean AG, Ladyman HM, Ritter MA and Hugo P. (1993). The thymic microenvironment. *Immunol Today*; 14: 445-59.

Bray SJ. (2006). Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*; 7:678-89.

Busillo JM and Benovic JL. (2006). Regulation of CXCR4 signaling. *BBA*; 1768:952-63. doi:10.1016/j.bbamem.2006.11.002.

Campese AF, Bellavia D, Gulino A, Screpanti I. (2003). Notch signalling at the crossroads of T cell development and leukemogenesis. *Cell & Development Biology*; 14, 151-157.

Campese AF, Garbe AI, Zhang F, Grassi F, Screpanti I, Von Boehmer H. (2006). Notch1 dependent lymphomagenesis is assisted by but does not essentially require pre-TCR signaling. *Blood* 2006; 108(1): 305-310. 536 537 29.

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP and Gurtner GC. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*; 10 (8):858-64.

Chung CN, Hamaguchi Y, Honjo T, Kawaichi M (1994) Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22: 2938–2944.

Ciofani M and Zuniga-Pflucker JC. (2005). Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol.*; 6:881-88.

Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD and Dubrovskaya A. (2013). Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Oncotargets and Therapy*; 6:1347-61.

De Lourdes Perim, M. K. Amarante, R. L. Guembarovski, C. E. C. de Oliveira, and M. A. E. Watanabe, “CXCL12/CXCR4 axis in the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL): a possible therapeutic target,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, no. 9, pp. 1715–1723, 2015.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Raj WJ, Goate A, Kopan R. (1999). A presenilin dependent gamma secretase like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*; 398(6727): 518-22.

Deftos ML and Bevan MJ. (2000). Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol*; 12:166-72.

Del Pozo MA, Nieto M, Serrador JM, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Martinez C and Sanchez-Madrid F. (1998). The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun*; 6:125-33.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD and Sklar J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*; 66:649-61.

Felli MP, Maroder M, Mitsiadis TA, Campese AF, Bellavia D, Vacca A, Mann RS, Frati L, Lendahl U, Gulino A, Screpanti I. (1999). Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int. Immunol*; 11:1017-25.

Felli MP, Vacca A, Calce A, Bellavia D, Campese AF, Grillo R, Di Giovine M, Checquolo S, Talora C, Palermo R, Di Mario G, Frati L, Gulino A, Screpanti I. (2005). PKC theta mediates pre-TCR signaling and contributes to Notch3-induced T-cell leukemia. *Oncogene*; 24:992-1000.

Franciosa G, Diluvio G, Del Gaudio F, Giuli M, Palermo R, Grazioli P, et al. (2016). Prolyl isomerase Pin1 controls Notch3 protein expression and regulates T-ALL progression. *Oncogene* 2016; 35(36): 4741-4751.

Gascoigne NR. (2008). Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat Rev Immunol*. 2008;8:895–900.

Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, et al. (2001). A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *The Journal of Immunology* 2001; 167(8): 4747-4757.

Godfrey D I, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *The Journal of Immunology* May 15, 1993, 150 (10) 4244-4252.

Goertzen CG, Dragan M, Turley E, Babwah AV, Bhattacharya M. (2016). KISS1R signaling promotes invadopodia formation in human breast cancer cell via β -arrestin2/ERK. *Cellular signalling* 2016; 28(3): 165-176.

Gordon WR, Arnett KL and Blacklow SC. (2008). The molecular logic of Notch signalling - A structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci*; 121:3109-19.

- Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, Brou C, Logeat F, Six E, Ciechanover A, and Israel A. (2001). Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J. Biol. Chem.* 276:34371–34378.
- Halkias J, Melichar HJ, Taylor KT, et al. (2013). Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. *J Clin Invest.* 2013;123(5):2131–2142. doi:10.1172/JCI67175.
- Halkias J, Melichar HJ, Taylor KT, Robey EA. (2014). Tracking migration during human T cell development. *Cellular and Molecular Life Sciences*; s00018-014-1607-2.
- Hasserjian R.P., Aster J.C., Davi F., Weinberg D.S. and Sklar J. (1996). Modulated expression of Notch1 during thymocyte development. *Blood*; 88:970-976.
- Homminga I, Pieters R, Langerak AW, de Rooij JJ, Stubbs A, Verstegen M, et al. (2011). Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acutelymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 2011; 19:484–97.
- Hosoya T, Maillard I and Engel JD. (2010). From the cradle to the grave: activities of GATA-3 throughout T-cell development and differentiation. *Imm. Rev.*; 238:110-25.
- Hupfeld CJ, Resnik JL, Ugi S, Olefsky JM. (2005). Insulin-induced β -arrestin1 Ser-412 phosphorylation is a mechanism for desensitization of ERK activation by G α i-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(2): 1016-1023. 600 601 45.
- James KD, Jenkinson WE, Anderson G. (2018). T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? *J Leukoc Biol.* 2018;104(2):275–284. doi:10.1002/JLB.1MR1217-496R.
- Janas L and Turner M. (2010). Stromal cell-derived factor 1 α and CXCR4: newly defined requirements for efficient thymic β -selection. *Trends in immunology*; 31 (10).
- Janas ML, Varano G, Gudmundsson K, Noda M, Nagasawa T and Turner M. (2010). Thymic development beyond β -selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. *J. Exp. Med.*; 207 (1):247-61.
- Jenkinson EJ, Jenkinson WE, Rossi SW and Anderson G. (2006). The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nat. Rev.*; 6:551-55.

- Kidd S, Kelley MR and Young MW. (1986). Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol. Cell. Biol.*; 6 (9):3094-108.
- Kovacs JJ, Hara MR, Davenport CL, Kim J, Lefkowitz RJ. (2009). Arrestin development: emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. *Dev Cell*. 2009;17(4):443–458. doi:10.1016/j.devcel.2009.09.01.
- Kovall RA and Hendrickson RA. (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J.*; 23:3441-51.
- Kroeger KM, Pflieger KD and Eidne KA. (2003). G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol*; 24:254-278.
- Kuksin CA, Gonzalez-Perez G, Minter LM. (2015). CXCR4 expression on pathogenic T cells facilitates their bone marrow infiltration in a mouse model of aplastic anemia. *Blood* 2015; 125(13): 2087-2094.
- Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, Bramati PS, Bradfield L, Edgar CE and Hedin KE. (2006). CXCR4 Physically Associates with the T Cell Receptor to Signal in T Cells. *Immunity*; 25:213-24.
- Laurence AD. (2006). Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. *Br J Haematol.*;132(3):255-67.
- Lin F-T, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, et al. (1997). Clathrin mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/ dephosphorylation of β -arrestin1. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(49): 31051-31057.
- Lin F-T, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (1999). Feedback regulation of β -arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(23): 15971-15974. 576
- Lind EF, Prockop SE, Porritt HE and Petrie HT. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp Med*; 194:127-34.

- Liu T, Li X, You S, Bhuyan SS, Dong L. (2015) Effectiveness of AMD3100 in treatment of leukemia and solid tumors: from original discovery to use in current clinical practice. *Exp Hematol Oncol.* 2015; 5:19.
- Lubman OY, Ilagan MX, Kopan R and Barrick D. (2007). Quantitative dissection of the Notch: CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. *J Mol Biol*; 365:577-89.
- Luttrell L, Ferguson S, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca G, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1999). β -Arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science.* 1999; 283:655–61.
- MacDonald HR and Wilson A. (1998). The role of the T-cell receptor (TCR) in alpha beta/gamma delta lineage commitment: clues from intracellular TCR staining. *Immunol Rev*; 165:87-94.
- Maillard I, Fang T and Pear WS. (2005). Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu. Rev. Immunol.*; 23:945-74.
- Mandal M, Borowski C, Palomero T, Ferrando AA, Oberdoerffer P, Meng F, Ruiz-Vela A, Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC, Screpanti I, Look AT, Korsmeyer SJ, Rajewsky K, von Boehmer H and Aifantis I. (2005). The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J. Exp. Med.*; 201:603-14.
- Marchese A, Trejo J. (2013). Ubiquitin-dependent regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling. *Cellular signalling* 2013; 25(3): 707-716. 569 570 13.
- Massimi I, Ciuffetta A, Temperilli F, Ferrandino F, Zicari A, Pulcinelli FM, Felli MP. (2015). Multidrug resistance protein-4 influences aspirin toxicity in human cell line. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:607957.
- Melo RCC, Longhini AL, Bigarella CL, Baratti MO, Traina F, Favaro P, de Melo Campos P, Saad ST. (2014). CXCR7 is highly expressed in acute lymphoblastic leukemia and potentiates CXCR4 response to CXCL12 *PloS one*, 9(1), e85926. doi:10.1371/journal.pone.0085926.
- Milner LA and Bigas A. (1999). Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*; 93:2431-48.

Mirandola L, Apicella L, Colombo M, Yu Y, Berta DG, Platonova N, Lazzari E, Lancellotti M, Bulfamante G, Cobos E, Internati MC and Chiaramonte R (2013). Anti-Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1. *Leukemia*; 27:1558-66.

Mirandola L, Chiriva-Internati M, Montagna D, Locatelli F, Zecca M, Ranzani M, Basile A, Locati M, Cobos E, Kast WN, Asselta R, Paraboschi EM, Comi P and Chiaramonte R. (2012). Notch1 regulates chemotaxis and proliferation by controlling the CC-chemokine receptors 5 and 9 in T cell acute Lymphoblastic leukaemia. *J Pathol.*; 226 (5):713-22.

Mukherjee A, Veraksa A, Bauer A, Rosse C, Camonis J, Artavanis-Tsakonas S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual β -arrestin. *Nat Cell Biol* 7, 1191–1201 (2005) doi:10.1038/ncb1327.

Nam Y, Weng AP, Aster JC and Blacklow SC. (2003). Structural requirements for assembly of the CSL intracellular Notch1 Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *J Biol Chem*; 278:21232-39.

Nichols JT, Miyamoto A, Olsen SL, D'Souza B, Yao C, Weinmaster G. (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol.*; 176(4):445-58.

Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, and Takahama Y (2008). Thymic Microenvironments for T-Cell Repertoire Formation. *Advances in Immunology*; (99): 60-76.

Oberg C, Li J, Pauley A, Wolf E, Gurney M, and Lendahl U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J. Biol. Chem.* 276:35847–35853.

Osborne B and Miele L. (1999). Notch and the immune system. *Immunity*; 11:653-63.

Parham P (2009). The Immune System. 3rd edition. *New York: Garland Science.* pp. 22–223.

Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, Gachet S, De Jesus CDC, Lasgi C, et al. CXCR4 is required for leukemia-initiating cell activity in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell* 2015; 27(6): 769-779.

- Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J and Baltimore D. (1996). Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J. Exp. Med.*; 183:2283-91.
- Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H, Trimarchi T, King B, Gong Y, Sanchez-Martin M, Tsigos A, Littman DR, Ferrando AA, Morrison SJ, Fooksman DR, Aifantis I, Schwab SR. (2015). CXCL12-producing vascular endothelial niches control acute T cell leukemia maintenance. *Cancer cell* 2015; 27(6): 755-768. 528.
- Plotkin J, Prockop SE, Lepique A and Petrie HT. (2003). Critical Role for CXCR4 Signaling in Progenitor Localization and T Cell Differentiation in the Postnatal Thymus. *The Journal of Immunology*; 171:4521-27.
- Puca L, Brou C. (2014). α -Arrestins – new players in Notch and GPCR signaling pathways in mammals. *Journal of Cell Science* 2014 127: 1359-1367; doi: 10.1242/jcs.142539.
- Puca L, Chastagner P, Meas-Yedid V, Israël A, Brou C. (2013). α -arrestin 1 (ARRDC1) and β -arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *J Cell Sci* 2013 126: 4457-4468; doi: 10.1242/jcs.130500.
- Radtke F, Fasnacht N and Macdonald HR. (2010). Notch signaling in the immune system. *Immunity*; 32:14-27.
- Radtke F, Wilson A, Star G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR and Aguet M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*; 10:547-58.
- Reiner SL. (2007). Development in motion: helper T cells at work. *Cell*; 129:33-6.
- Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G and Salmon P. (1996). An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell*; 87:483-92.
- Rodewald HR. (2008). Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol*; 26:355-88.
- Rossi D and Zlotnik A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.*; 18:217-42.
- Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. (2007). Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Neuroscience Nat Rev Neurosci*. 2007; 8:895–903.

Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A. (2005). Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat. Imm.*; 6 (7):663-70.

Scupoli MT, Donatelli M, Cioffi F, Rossi M, Perbellini O, Malpeli G, Corbioli S, Vinante F, Krampera M, Palmieri M, Scarpa A, Ariola C, Foà R, Pizzolo G. (2008). Bone marrow stromal cells and the upregulation of interleukin-8 production in human T-cell acute lymphoblastic leukemia through the CXCL12/CXCR4 axis and the NF- κ B and JNK-AP-1 pathways. *Haematologica*; 93 (4):524-32.

Starr TK, Jameson SC and Hogquist KA. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*; 21:139-76.

Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ and Wang J. (2010). CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Rev.*; 29 (4):709-22.

Talora C, Campese AF, Bellavia D, Pascucci M, Checquolo S, Groppioni M, Frati L, von Boehmer H, Gulino A and Screpanti I. (2003). Pre-TCR-triggered ERK signalling-dependent downregulation of E2A activity in Notch3-induced T-cell lymphoma. *EMBO reports*; 4 (11):1067-72.

Talora C, Cialfi S, Oliviero C, Palermo R, Pascucci M, Frati L, Vacca A, Gulino A, Screpanti I. (2006). Cross talk among Notch3, pre-TCR, and Tal1 in T-cell development and leukemogenesis. *Blood*. 2006; 107:3313–20.

Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol*; 5:1416-23.

Tramont PC, Tramont AC, Shen Y, Duley AK, Bender TP, Sutherland AE, Littman DR and Ravichandran K.S. (2010). CXCR4 acts as a costimulator during thymic β selection. *Nat. Immunology*; 11(2):162-70.

Tun T, Hamaguchi Y, Matsunami N, Furukawa T, Honjo T, Kawaichi M (1994) Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22: 965–971.

- Uckun FM, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, Heerema NA, Sather HN, Reaman GH, Gaynon PS. (1998). Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;91: 735-46.
- Uto-Konomi A, McKibben B, Wirtz J, Sato Y, Takano A, Nanki T, Suzuki S. (2013). CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 431:772–776. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.032.
- Vacca A, Felli MP, Palermo R, Di Mario G, Calce A, Di Giovine M, et al. (2006). Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF- κ B pathways in T-cell development and leukemia. *EMBO J.* 2006;25:1000–8.
- Vacca A, Felli MP, Palermo R, et al. (2005). Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *EMBO J.* 2006;25(5):1000–1008. doi:10.1038/sj.emboj.7600996.
- von Boehmer H, Aifantis I, Feinberg J, Lechner O, Saint-Ruf C, Walter U, Buer J, Azogui O. (1999). Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor, *Current Opinion in Immunology*, Volume 11, Issue 2, 1999, Pages 135-142, ISSN 0952-7915, [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80024-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80024-7).
- Wang L, Wang YC, Hu XB, et al. Notch-RBP-J signaling regulates the mobilization and function of endothelial progenitor cells by dynamic modulation of CXCR4 expression in mice. *PLoS One.* 2009;4(10): e7572. Published 2009 Oct 27. doi:10.1371/journal.pone.0007572.
- Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes BJ, Cado D and Robey E. (1997). Notch activity influences the $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T cell lineage decision. *Cell*; 88:833-43.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004 Oct 8;306(5694):269-71.
- Weng AP, Nam Y, Wolfe MS, Pear WS, Griffin JD, Blacklow SC and Aster JC. (2003). Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol Cell Biol.*; 23(2):655-64.

Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*; 43 (3):567-81.

Xie J, Wang W, Si JW, Miao XY, Li JC, Wang YC, Wang ZR, Ma J, Zhao XC, Li Z, Yi H and Han H. (2013). Notch signaling regulates expression and the migration of mesenchymal stem cells. *Cellular Immunology*; 281:68-75.

Ziegler A, Müller CA, Böckmann RA and Uchanska-Ziegler B. (2008). Low-affinity peptides and T-cell selection. *Cell Press*; 1471-4906.