



SAPIENZA UNIVERSITA' DI ROMA

Dottorato di Ricerca Medicina Molecolare

XXV ciclo

**Interazione in cis di Notch3 e Jagged1:  
identificazione di un nuovo meccanismo molecolare coinvolto nella  
progressione della leucemia linfoblastica acuta a cellule T**

CANDIDATA: Maria Pelullo

RELATORE: Prof. Alberto Gulino  
(Dipartimento Medicina Molecolare)

Tutor: Prof.ssa Diana Bellavia  
(Dipartimento Medicina Molecolare)

Anno Accademico 2011/2012

## INDICE

<b>1. NOTCH: UNA FAMIGLIA DI RECETTORI TRANSMEMBRANA.....</b>	<b>3</b>
<b>2. IL DIFFERENZIAMENTO TIMOCITARIO .....</b>	<b>6</b>
<b>3. IL RUOLO DI NOTCH NEL DIFFERENZIAMENTO TIMOCITARIO E NELLO SVILUPPO DI LEUCEMIE A CELLULE T.....</b>	<b>6</b>
<b>4. I LIGANDI DEI RECETTORI NOTCH.....</b>	<b>9</b>
4.1. MECCANISMI DI REGOLAZIONE DEI LIGANDI DSL .....	14
<b>5. INTERAZIONE TRA I RECETTORI NOTCH E I LIGANDI DSL: NOTCH3 E JAGGED1 .....</b>	<b>21</b>
5.1. LE METALLOPROTEINASI: ADAM .....	21
5.1.1 ADAM17/TACE.....	25
5.2. IL PROCESSAMENTO DEI LIGANDI DSL .....	28
<b>PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>31</b>
1. SCOPO DEL LAVORO.....	31
<b>2. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>34</b>
2.1 MODELLO MURINO UTILIZZATO: TOPO TRANSGENICO NOTCH3-IC.....	34
2.2 RECUPERO DEI LINFOCITI DAL TIMO .....	34
2.3 ANALISI CITOFLUORIMETRICA.....	34
2.4 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI TOTALI E FRAZIONATI DA CELLULE IN VITRO ED EX-VIVO	35
2.5 SAGGIO DI WESTERN BLOTT.....	36
2.6 LINEE CELLULARI.....	37
2.7 TRATTAMENTI CELLULARI .....	38
2.8 PLASMIDI.....	38
2.9 CLONAGGIO .....	39
2.10 TRANSFEZIONI CELLULARI E SAGGI DI LUCIFERASI.....	39
2.11 ANALISI DI RT-PCR .....	40
2.12 RNA CHIP.....	41
2.13 RATFS.....	43
2.14 IMMUNOFLUORESCENZA.....	44
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>45</b>
3.1 PROCESSAMENTO COSTITUTIVO DEL LIGANDO JAGGED1 NELLA LEUCEMIA/LINFOMA A CELLULE T INDOTTA DA NOTCH3-IC.....	45
3.3 JAGGED1 È UN DIRETTO BERSAGLIO DELLA VIA DI SEGNALEZIONE DI NOTCH3 E SOSTIENE LA PROPRIA ATTIVAZIONE IN MODO AUTOCRINO.....	54
3.4 SJAG1 ECD ATTIVA LA VIA DI SEGNALEZIONE DI NOTCH3 NELLE CELLULE ADIACENTI .....	59
3.5 TIMOCITI E CELLE LINFOMATOSE DERIVANTI DAL TOPO TRANSGENICO NOTCH3-IC MOSTRANO UN PROCESSAMENTO COSTITUTIVO DEL LIGANDO JAGGED1.....	61
<b>4. DISCUSSIONE .....</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURE.....</b>	<b>79</b>

## 1. Notch: una famiglia di recettori transmembrana

La famiglia dei geni Notch codifica per proteine recettoriali transmembrana coinvolte nel controllo delle principali tappe differenziative di numerosi tipi cellulari e nella regolazione dello sviluppo di diversi organismi multicellulari (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

La struttura e la via di segnalazione delle proteine Notch sono significativamente conservate nell'evoluzione dei metazoi: dagli insetti, ai nematodi, sino ai mammiferi. L'unico gene *notch* di *D.Melanogaster*, originariamente descritto nella neurogenesi, ha una controparte altamente omologa nei due geni correlati *lin-12* e *gpl-1* di *C.elegans*, e nei quattro geni della famiglia (*notch1-4*) identificati nei mammiferi (Lardelli et al., 1995).

I geni *notch* codificano per proteine recettoriali transmembrana a singolo passo di circa 300kDa, aventi un'ampia porzione extracellulare, coinvolta nell'interazione con i ligandi DSL ed una coda intracitoplasmatica, responsabile della trasduzione del segnale. (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Il dominio extracellulare (circa 1700 aa) si compone di 29-36 ripetizioni in tandem tipo EGF, seguite da tre ripetizioni Notch/Lin-12 (LNR) ricche in cisteina, probabilmente implicate nel mantenimento del recettore in uno stato inattivo in assenza di legame. La regione intracellulare (circa 1000 aa) contiene diversi domini RAM, coinvolti nell'interazione proteina-proteina, e sei domini ripetuti tipo-anchirina (Ank/cdc10), altamente conservati, ai cui margini sono poste due sequenze di localizzazione nucleare (NLS). L'estremità carbossiterminale comprende un dominio ricco in glutammina (OPA) e una regione PEST, ricca in prolina (P), acido glutammico (E), serina (S) e treonina (T); entrambi i domini sono implicati nei processi degradativi della proteina. Le proteine Notch degli invertebrati e Notch1-2 nei mammiferi presentano, inoltre, un dominio di attivazione trascrizionale (TAD).

I recettori Notch sono sintetizzati come precursori proteici. La forma immatura di Notch viene trasportata dal reticolo endoplasmatico (ER) all'apparato del Golgi dove la funzione di chaperone della O-fucosiltransferasi1 (OFUT1) determina la fucosilazione di residui glicosilati di serina e treonina (Okajima T., 2005). Questo evento ricopre un ruolo di fondamentale importanza nell'attivazione della trasduzione del segnale dipendente dal recettore Notch: i residui fucosilati sono riconosciuti dalle lectine responsabili della "clusterizzazione" dei ligandi in superficie, condizione importante affinché il legame recettore-ligando attivi il segnale a valle del recettore stesso (Panin V.M. et al., 2002).

Successivamente l'enzima Furin-like convertasi sarà in grado di clivare il precursore di Notch in un punto specifico (S1) originando un caratteristico recettore eterodimerico non associato covalentemente formato da un dominio extracellulare ed un dominio intracellulare, che sarà trasportato sulla membrana citoplasmatica (Blaumuller C.M., 1997).

La via di segnalazione dei recettori Notch viene innescata dal legame con numerosi ligandi di superficie o solubili che mediano l'interazione con le cellule adiacenti (Fleming et al., 1997). L'interazione ligando-recettore determina infatti una modificazione strutturale delle proteine recettoriali e l'esposizione dei due siti di clivaggio, uno immediatamente all'esterno del dominio transmembrana (S2) e l'altro all'interno della porzione intracellulare (S3). Il risultato ultimo di questa cascata di eventi è la liberazione del dominio intracellulare del recettore Notch3 (NIC), che traslocando nel nucleo, è in grado di modulare direttamente l'attività di alcuni fattori di trascrizione mediante il dominio RAM (RAM23) (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Il dominio intracellulare di Notch attivato interagisce fisicamente con le proteine della famiglia di regolatori trascrizionali CSL: Su(H) ('Suppressor of Hairless') in *D.melanogaster*, RBP-Jk nel topo e CBF1 nell'uomo. In assenza del signaling di Notch, le proteine CSL legano i promotori dei loro geni

bersaglio e reclutano una deacilasi istonica (*Morel V., 2001*) e corepressori come SMRT/Ncor e SHARP/MINT, che inibiscono la trascrizione (*Oswald F., 2005*).

L'interazione NICD/CSL converte tali repressori in attivatori trascrizionali, allontanando il complesso di repressori e reclutando coattivatori tramite il dominio ricco di Ank/cdc10, come Mastermind-like (MAML) (*Wu L., 2000*) che a sua volta recluterà altri coattivatori (*Jeffries S. et al. 2002; Davis R.L. et al. 2001*).

Numerosi sono i geni bersaglio del signaling di Notch anche se i più noti codificano per proteine della classe bHLH (basic-helix-loop-helix): i componenti del complesso E(Spl) ('Enhancer of Split') in *D.melanogaster* e le proteine della famiglia HES nei mammiferi (HES-1 ed HES-5) (*Davis R.L. et al. 2001*). Recente è inoltre l'osservazione che Notch, in particolare Notch3, può controllare i processi di trascrizione del promotore di pT $\alpha$  (*Bellavia D. et al; 2007*).

In tutti i modelli animali esaminati e nell'uomo le mutazioni di Notch provocano alterazioni dello sviluppo (*Artavanis-Tsakonas et al., 1999*). I recettori Notch sono in grado infatti di influenzare il destino cellulare, regolando lungo l'asse spaziale e temporale l'espressione genica della cellula bersaglio. Generalmente l'attivazione del recettore comporta la soppressione di geni tessuto-specifici, limitando il numero di cellule che intraprendono una via differenziativa e preservando alcuni progenitori indifferenziati, competenti nell'adottare un destino alternativo. In modo consistente, la perdita di funzione del recettore si traduce in fenomeni di differenziamento precoce e incontrollato.

L'azione di Notch nei processi di sviluppo è largamente influenzata dal profilo di espressione del recettore e dei suoi ligandi (*Milner and Bigas, 1999*). La diversità funzionale può essere regolata a vari livelli: espressione differenziale lungo l'asse temporale di diverse isoforme sia dei membri della famiglia di recettori Notch sia dei ligandi DSL nei vari tessuti o in un medesimo tessuto e nelle diverse popolazioni cellulari. Tale meccanismo è proprio, ad esempio, di Notch3 nello sviluppo dei sistemi nervoso e immunitario (*Lindsell et al., 1996; Felli et al, 1999*).

L'evoluzione di molteplici forme del recettore Notch e dei suoi ligandi specifici si riflette nel coinvolgimento in numerosi processi differenziativi cellulari. Particolarmente studiata negli ultimi anni è la funzione dei recettori Notch nel differenziamento dei linfociti T (Pear and Radtke, 2003).

## 2. Il differenziamento timocitario

Lo sviluppo dei linfociti T maturi ha inizio, nel topo e nell'uomo, dai precursori pluripotenti del fegato embrionale e del midollo osseo dell'adulto. Il raggiungimento dello stadio di maturazione ultimo avviene nel microambiente timico, dove un cross-talk tra le cellule stromali timiche e i precursori linfoidi determinerà l'attuarsi di eventi complessi riguardanti la sopravvivenza, la proliferazione e il differenziamento di tali cellule.

Gli stadi differenziativi intratimici sono scanditi dall'espressione di marcatori specifici intra ed extracellulari (Godfrey et al., 1993; Zuniga Plucker and Lenardo, 1996).

Quando precursori ematopoietici raggiungono il timo (stadio pro-T) non esprimono ancora il TCR (complesso recettoriale specifico dei linfociti T) poichè i geni delle catene  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  del recettore risultano silenti ed in configurazione germinale (non esprimono CD3, marcatore di superficie del TCR maturo). Inoltre mancano dell'espressione delle molecole corecettoriali CD4 e CD8; ciò consente di classificare tali cellule come timociti doppio negativi o DN (CD4-CD8-), rappresentanti l'1-2% dei timociti totali e localizzati in massima parte nella regione del seno subcapsulare del timo. Le cellule DN pro-T sono in grado di evolvere lungo due linee differenziative: i linfociti  $T\gamma\delta$  (solo il 5%) e i linfociti  $T\alpha\beta$

(MacDonald and Wilson, 1998). Nel successivo stadio di sviluppo (pre-T) ha inizio il riarrangiamento e la trascrizione dei geni del TCR. Le cellule che riarrangiano produttivamente le catene  $\gamma$  e  $\delta$  diverranno linfociti  $T_{\gamma\delta}$ , altrimenti verrà intrapresa la linea differenziativa  $T_{\alpha\beta}$  che, in questa fase precoce, assembla una forma immatura del TCR, il preTCR, in cui la catena  $\beta$  riarrangiata è associata con la catena invariante pT $\alpha$ . L'espressione differenziale dei corecettori CD4 e CD8 consente di distinguere le fasi successive di sviluppo dei timociti  $T_{\alpha\beta}$ . Le cellule DN di tale linea, infatti, procedono attraverso uno stadio di maturazione intermedio, caratterizzato dall'espressione di bassi livelli di CD3 e dalla coespressione in membrana dei due corecettori. I timociti doppio positivi o DP ( $CD4^+CD8^+$ ) rappresentano circa l'80% delle cellule in maturazione nel timo e si localizzano principalmente nella regione corticale interna dell'organo.

La transizione da cellule DN a timociti DP passa attraverso fenomeni di selezione e successiva proliferazione delle cellule che presentano un corretto riarrangiamento della catena  $\beta$  del TCR. Nel complesso tali processi prendono il nome di 'selezione  $\beta$ ', il cui superamento dà inizio al riarrangiamento e alla trascrizione della catena  $\alpha$ , consentendo ai timociti DP dello stadio successivo di esprimere in superficie una forma matura del complesso del  $TCR_{\alpha\beta}$ .

I timociti DP migrano dalla zona corticale alla midollare. Durante questa transizione si verifica la selezione positiva e negativa dei timociti mediante l'interazione tra il TCR e gli antigeni "self" o "non-self", associati con le molecole MHC. Ciò determinerà la formazione di due possibili eventi differenziativi: immunità o tolleranza al self. I timociti DP che riconoscono l'antigene "non-self" associato al complesso MHC di classe I o II, proseguiranno verso stadi maturativi finali, rappresentati dalle cellule singole positive (SP) (Jameson and Bevan, 1998). I linfociti SP  $CD4^-CD8^+$  (circa il 3% del numero assoluto di un timo murino adulto) derivano dal riconoscimento dell'antigene in associazione a molecole MHC di classe I svolgeranno funzioni citotossiche. I linfociti SP  $CD4^+CD8^-$  (circa il 12%)

derivano dal riconoscimento dell'antigene in associazione a molecole MHC di classe II e avranno funzioni di tipo 'helper'.

Le cellule singole positive esprimono alti livelli di CD3 e rappresentano le popolazioni di linfociti T maturi, che migreranno dal timo per colonizzare gli organi linfoidi periferici.

### **3. Il ruolo di Notch nel differenziamento timocitario e nello sviluppo di leucemie a cellule T**

Le leucemie linfoblastiche acute a cellule T sono disordini neoplastici che originano nei precursori linfoidi; rappresentano il 15-20% delle ALL. Si sviluppano con un'incidenza maggiore nei bambini di età inferiore ai 5 anni e negli adolescenti rispetto agli adulti. Caratteristiche diagnostiche sono epatomegalia, splenomegalia e linfadenopatia. Si assiste all' aumento numerico dei linfociti prevalentemente immaturi (blasti) sia negli organi centrali sia in periferia. Si accumulano, inoltre, larghe masse mediastinali che causano compressione tracheale e difficoltà respiratorie. Sebbene l'organo bersaglio delle T-ALL sia il timo, la patologia si distribuisce in tutto il corpo e in assenza di terapia l'esito è fatale.

Le trasformazioni neoplastiche dei timociti sono causate da mutazioni geniche che portano le cellule normali ad intraprendere una crescita incontrollata. Questi cambiamenti possono colpire il controllo del ciclo cellulare, e gli eventi di differenziazione e sopravvivenza cellulare.

La causa inizialmente identificata come responsabile dell'insorgenza della T-ALL è una traslocazione cromosomica dell'omologo umano di Notch1, TAN1 (*Ellisen et al.*, 1991). In alcuni pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) fu individuata tale traslocazione cromosomica che causava la fusione della porzione codificante per il dominio intracellulare della proteina TAN1 con elementi



del promotore del gene per il TCR $\beta$ . Il prodotto di tale traslocazione consisteva in una forma tronca della proteina TAN-1, mancante della maggior parte del dominio extracellulare ed in grado di indurre un'attivazione costitutiva della via di segnalazione di Notch.

Un forte sostegno al ruolo oncogenico di TAN-1 è dato da esperimenti di trapianto, in topi precedentemente irradiati, di precursori midollari murini sovraesprimenti il dominio intracellulare della proteina mediante trasduzione con virus ricombinanti. Nella totalità dei casi viene indotta l'insorgenza di leucemie a cellule T con fenotipo di timociti immaturi (DN e DP) (Pear et al., 1996; Aster et al., 2000).

È proprio il signaling aberrante di Notch a ricoprire un ruolo centrale nella patogenesi delle leucemie linfoblastiche a cellule T nell'uomo e nel modello sperimentale murino.

Ulteriore contributo nella comprensione dei meccanismi molecolari nel processo patogenetico della T-ALL è stata la caratterizzazione di un modello murino transgenico per il dominio intracellulare del recettore Notch3 (Notch3-IC), reso costitutivamente attivo nel compartimento timocitario poiché inserito sotto il controllo del promotore prossimale dell'*lck* e valutabile dall'espressione aumentata dei geni target HES-1 e Deltex. Ciò ha permesso di estendere il coinvolgimento nei processi di linfomagenesi a cellule T ad altri membri della famiglia Notch (Bellavia et al., 2000). I topi transgenici Notch3-IC, infatti, sviluppano invariabilmente una forma precoce e aggressiva di leucemia/linfoma a cellule T con un decorso clinico rapido che ricorda le T-ALL umane dell'infanzia.

Tutti i casi descritti di associazione dei geni *notch* allo sviluppo di neoplasie a cellule T sono riconducibili all'espressione costitutiva del dominio intracellulare della proteina, dimostrando che questo rappresenta il dominio funzionalmente attivo e suggerendo un suo ruolo fisiologico nel differenziamento timocitario.

In tale contesto, le funzioni di Notch1 sono state chiarite grazie a vari studi in modelli animali. In particolare è stata evidenziata una funzione del recettore nel

favorire le scelte differenziali  $T\alpha\beta$  contro  $T\gamma\delta$  (Washburn et al., 1997) e SP  $CD8^+$  rispetto alla controparte  $CD4^+$  (Robey et al., 1996; Deftos et al., 2000; Fowlkes and Robey, 2002).

La funzione principale di Notch1 è tuttavia svolta in una fase più precoce, a livello della scelta tra le linee differenziali T e B nei precursori midollari, dove favorisce l'indirizzamento verso la linea linfocitaria T ed induce un'inibizione del differenziamento dei linfociti B (Radtke et al., 1999; Pui et al., 1999).

L'esistenza di diverse isoforme di recettori Notch pone la questione di un loro ruolo specifico nel differenziamento timocitario. È stato descritto un profilo di espressione differenziale dei recettori Notch1 e Notch3 nel corso dei diversi stadi di sviluppo intratimico (Felli et al., 1999). In particolare, i livelli di espressione del recettore Notch3 sono significativamente più alti negli ultimi due stadi delle DN, per poi subire una netta diminuzione dopo la transizione DN-DP che lo porta ad essere espresso a livelli estremamente bassi nelle cellule giunte a maturazione (Felli et al., 1999).

Il ruolo non ridondante del recettore Notch3 nello sviluppo intratimico è stato confermato dall'analisi di topi transgenici per il suo dominio intracellulare (Notch3-IC) (Bellavia et al., 2000). L'analisi temporale del fenotipo timocitario nel modello murino ha evidenziato che fin dalla quarta settimana si ha un accumulo di cellule agli stadi DNII e DNIII. Inoltre, i timociti pre-tumorali e le cellule linfomatose presentano caratteristiche che consentono di individuare in questi stadi tardivi di sviluppo il bersaglio iniziale delle alterazioni indotte dalla disregolazione di Notch3. In particolare, persiste l'espressione del gene del CD25 ed è presente un'espressione costitutiva di  $pT\alpha$ , che consente la formazione del complesso del preTCR. Inoltre, si osserva un'attivazione costitutiva del complesso NF- $\kappa$ B, fattore di trascrizione implicato in processi oncogenici ed avente un ruolo specifico nel

regolare sopravvivenza e differenziamento cellulare a livello della transizione CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>→CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Voll et al., 2000).

Tali dati suggeriscono che il recettore Notch3 eserciti un controllo negli eventi cruciali che si verificano nella fase di transizione DN→DP, in accordo con il suo normale profilo di espressione. È dunque possibile che la persistente attivazione del recettore Notch3 alteri l'insieme dei meccanismi che coordina nei processi di proliferazione, crescita e differenziamento cellulare nella fase di transizione preT-T, costituendo il punto di partenza per ulteriori eventi di trasformazione. (Bellavia et al., 2000).

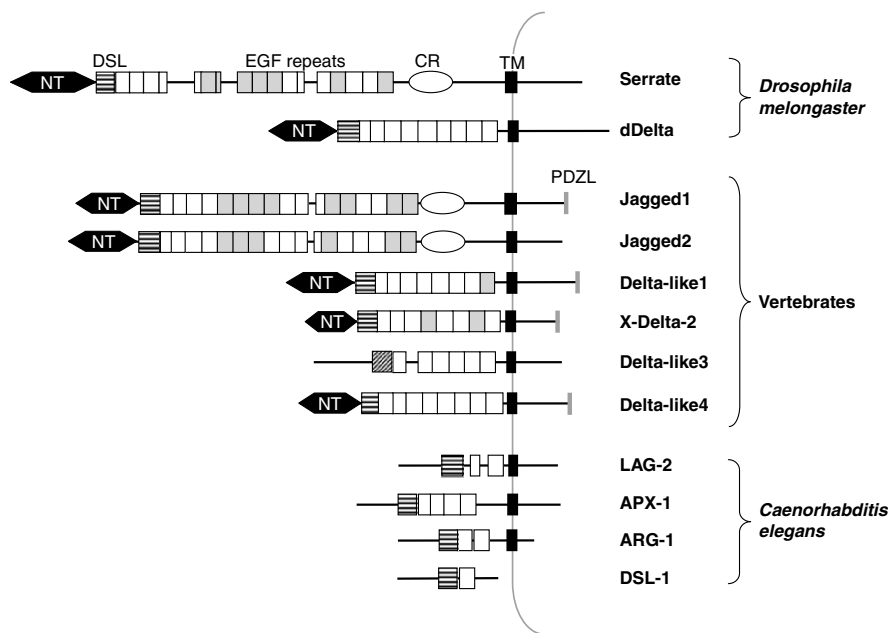
#### **4. I ligandi dei recettori Notch**

L'importanza del ruolo regolatorio svolto dai recettori Notch nel delicato meccanismo di sviluppo degli organismi, multicellulari nella scelta del destino differenziativo, nella proliferazione e nel “*homing*” cellulare è definito da anni.

Una maggiore comprensione di tale processo di regolazione deriva dall'ampliamento delle conoscenze sui ligandi di tali recettori e dal modo in cui essi cooperano con i diversi recettori della famiglia Notch. Infatti, non sorprende come difetti strutturali e funzionali dei ligandi di Notch siano associati con malattie ereditarie come la Sindrome di Alagille, la disostosi spondilo-costale e diversi disordini neoplastici (Piccoli et al., 2001; Leong et al., 2006; Koch et al., 2007).

La letteratura classifica tali ligandi in due gruppi: canonici e non canonici.

I ligandi canonici dei recettori Notch, Delta, Jagged/Serrate e Lag-2 appartengono alla famiglia di proteine DSL altamente conservate evolutivamente in *D.Melanogaster*, *C. Elegans* e nei Vertebrati.



Nichols J.T., Miyamoto A., Weinmaster G. *Notch signaling-Constantly on the move* Traffic 2007; 8: 959-969

In *Drosophila* si conoscono solamente una proteina Delta e una Serrate; analogamente in *C. Elegans* e denominare Lag-2 e APX-1. Nei mammiferi, uomo e topo, sono note tre proteine omologhe di Delta (Dil-1,-3, -4) e due omologhe di Serrate (Jagged1 e 2).

I ligandi canonici sono glicoproteine trans membrana e la loro struttura molecolare è oggi nota. A partire dall'estremità N-terminale sono costituiti da un dominio DSL (Delta/Serrate like è coinvolto nel legame con le ripetizioni EGF-like 11 e 12 del recettore Notch (Arias A.M. et al, 2007). Tale dominio è seguito da ripetizione EGF-like il cui numero varia sostanzialmente tra i membri della famiglia Delta quelli della di Jagged/Serrate. Inoltre, i ligandi Jagged/Serrate contengono un dominio extracellulare ricco in cisteine (CR) avente una parziale omologia con il dominio di tipo C del fattore di von Willebrand mancante tuttavia della regione terminale CCX8C (Weinmaster G et al., 2008).

La regione intracellulare delle proteine DSL varia in lunghezza e la sequenza aminoacidica non è conservata tra i diversi ligandi.; per esempio non c'è omologia tra i primi 125 aminoacidi intracellulari di Jagged1 e i 154 di Delta-1. Inoltre è oggi nota la presenza di un dominio di legame intracellulare di pochi aminoacidi (6 aa in Jagged1) denominato PDZ-ligando(PSD-95/Dlg/Zo-1) (*Capobianco A.J. et al., 2003*). Dati di letteratura evidenziano la mancanza di tale dominio PDZ nel C-terminale di Dll-3 e Jagged2 (*Pintar A. et al., 2007*). Il ruolo svolto da questo dominio è ad oggi ancora poco chiaro, ma nel caso del ligando Jagged1 sembra svolgere un ruolo importante nell'ambito della trasformazione neoplastica (*Capobianco A.J., 2003*).

I ligandi non canonici sono strutturalmente diversi ed includono proteine integrali di membrana, proteine leganti il guanosilfosfatidilinositolo(GPI-linked), e proteine secrete.

Tra queste proteine troviamo: **Delta-like 1(Dlk-1), Delta/Notch-like EGF related receptor (DNER), JEDI, NB3/contactin6, F3/contactin3, Scabrous (Sca), Wingless (Wg), CCN3/NOV, MAGP-2, MAGP-1.**

Ligand	Ligand Structure	Notch-binding domain of ligand	Ligand-binding domain of Notch	Effect on Notch signaling	Proposed Notch signaling effector(s)
Jagged1		NT/DSL/EGF1+2	EGF11-12	trans - activation cis - inhibition	CSL
Delta-like1		NT/DSL/EGF1-2	EGF11-12	trans - activation cis - inhibition	CSL
Dlk-1/Pref-1		EGF1-2 or EGF5-6	EGF10-11 or EGF12-13	cis -inhibition trans - activation?	CSL
DNER		DNER EGF1-2	Full-length*	trans - activation	CSL or Deltex
Jedi		Not tested	Not tested	inhibition (as secreted protein)	CSL
F3/Contactin1		Full-length*	EGF1-13, EGF 22-34	trans - activation	Deltex
NB3/Contactin6		Full-length*	EGF22-34	trans - activation	Deltex
scabrous		Full-length*	Full-length*	trans - activation	CSL
wingless		Full-length*	EGF19-36	trans - activation	Unknown
CCN3/NOV		C-terminal cysteine knot	EGF repeats	cis -activation/ modulator?	CSL
MAGP-2		Matrix binding domain	EGF repeats	cis -activation/ modulator?	CSL
MAGP-1		Full-length*	Full-length*	cis -activation/ modulator?	CSL

D'Souza B., A. Myamoto, Weinmaster G *Tha many facets of Notch ligands* Oncogene 2008; 27: 5148-5167

Dlk-1 è conosciuta anche come Pref-1 o FA-1. Manca del dominio DSL caratteristico dei ligandi canonici. Sembra svolga un ruolo inibitorio del signaling di Notch attraverso una interazione in *cis* con il recettore.

DENER, proteina transmembrana avente ripetizioni EGF-like ma mancante del dominio DSL, è localizzata prevalentemente nelle cellule del Purkinje dove svolge un ruolo attivatorio del signaling di Notch legando i recettori in trans sulle cellule adiacenti di Bergmann.

Jedi non contiene nel dominio putativo DSL e nelle ripetizioni EGF-like i residui cisteinici comuni nei ligandi canonici, infatti all'N-terminale costituito da un dominio emilin-like seguono multiple ripetizioni in tandem di un dominio EGF-like costituito da otto cisteine che non sono laminina-like, intersperse con due singole ripetizioni EGF-like con sei cisteine. Non sembra avere nella sua forma trans membrana né un ruolo *trans*-attivatorio né *cis*-inibitorio. Quest'ultimo si delinea solo quando Jedi è nella forma solubile.

F3/contactin1 e NB3/contactin6 sono molecole coinvolte nella formazione di giunzioni nelle cellule neuronali. Sono costituite a partire dall'N-terminale da un dominio IgCAM, un dominio di fibronectina III: FNIII e una regione intracellulare costituita da residui leganti il GPI. Esplicano un ruolo sia *trans*-attivatorio sia *cis*-inibitorio.

Sca e Wg, sono ligandi solubili in *D. Melanogaster* le cui funzioni sono ancora da delucidare. Si ipotizza che Sca sia coinvolta nello sviluppo degli ommatidi attivando geni target di Notch quali E(spl)C m3.

CCN3/NOV (fattore di crescita del tessuto connettivo/ricco in cisteine/overespresso nel neuroblastoma) è richiesto per lo sviluppo del cuore e dello scheletro dei vertebrati. Sembra svolga sia ruoli attivatori sia inibitori nella

carcinogenesi. Contiene molti domini di legame proteina-proteina, infatti si pensa possa interagire con diverse integrine, come Notch, enfatizzandone il signaling prevalentemente in modo autocrino (*Weinmaster G. et al., 2008*). Recentemente è stato dimostrato anche un ruolo di cofattore nell'attivazione del signaling di Notch mediato dai ligandi canonici-DSL(*Gupta et al., 2007*).

MAGP-1 e MAGP-2, glicoproteine associate alla microfibrille, contengono un dominio legante le micro fibrille,MBD e un dominio aggiuntivo ricco in glutammina (Q) per MAGP-1 o legante le integrine (RGD) per MAGP-2. Il loro è prevalentemente attivatorio del signaling di Notch in maniera autocrina (*Weinmaster G. et al., 2008*).

Una breve attenzione deve essere rivolta al meccanismo inibitorio del signaling di Notch ligando dipendente.

Ad oggi due sono i modelli accettati per tale evento: un'interazione intercellulare ligando.ligando che sottrae quest'ultimi dal legame con il recettore o un legame intracellulare ligando-recettore che previene l'attivazione del signaling. Questi modelli che non trovano ancora spiegazioni molecolari sono supportati solo da evidenze sperimentali a carico delle interazioni inter- ed intracellulari N-DI (*Park set al., 2006; Sakamoto et al., 2002*).

#### 4.1. Meccanismi di regolazione dei ligandi DSL

L'attività funzionale delle proteine è finemente regolata da molteplici meccanismi che determinando cambiamenti chimici e/o molecolari sono in grado di dettare l'espressione, il funzionamento e il loro ruolo nei vari signaling biologici.

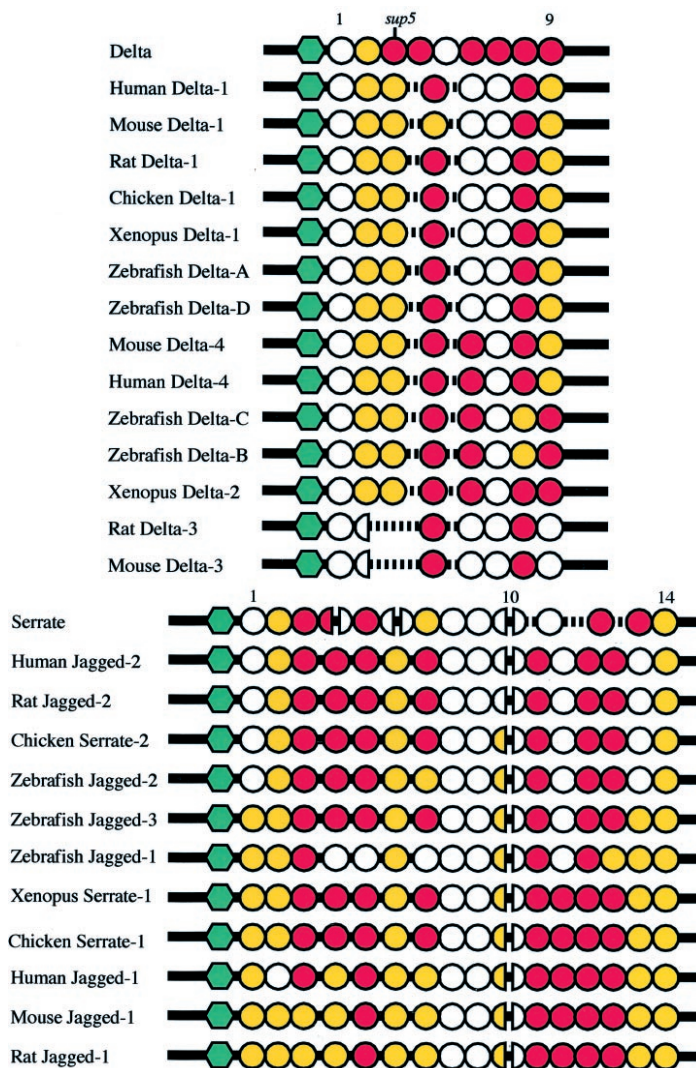
Per i ligandi canonici DSL dei recettori Notch sono stati identificati diversi meccanismi regolatori della loro attività: glicosilazione, ubiquitinazione e proteolisi. Quest'ultimi coinvolti nel poliedrico evento di endocitosi.

Tutti esercitano un'azione sincrona nel regolare la complessa via di segnalazione innescata dai recettori Notch.

Eventi di glicosilazione a carico dei recettori della famiglia Notch sono noti in letteratura (*Okajima T. et al, 2005; Moloney D.J. et al., 2000*).

Recenti studi hanno evidenziato come un simile meccanismo possa avvenire anche a carico dei ligandi canonici dei recettori Notch, regolando in qualche modo l'attività di questi e la loro affinità nel legare i recettori attivandone il signaling a valle. Panin e collaboratori hanno ampiamente dimostrato il ruolo svolto dalla O-fucosiltransferasi-1 (O-FucT-1) nell'aggiunta di un residuo di O-fucosio in siti conservati delle ripetizioni EGF-like. L'aggiunta di tale gruppo coinvolge prevalentemente un residuo di Ser o Thr tipicamente conservato in una sequenza consenso presente all'interno delle ripetizioni EGF-like: C<sup>2</sup>XXGG(S/T)C<sup>3</sup>, dove C<sup>2</sup> e C<sup>3</sup> rappresentano la seconda e la terza Cys conservata in tali ripetizioni. L'identificazione di tale sito di fucosilazione deriva da studi di analisi di sequenze nei ligandi Delta e Jagged di diversi organismi (*Panin V.M., 2002*).





Panin V.M., Shao L., Lai L., Moloney D.J., Irvine K.D., Haltiwanger R.S. *Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and fringe*. J. Of Biological Chemistry 2002; 277: 29945-29952

Inoltre lo stesso gruppo di ricerca ha delinato anche il coinvolgimento di un ulteriore evento di modificazione a carico dei ligandi, quest'ultimo riguardante i membri della famiglia Fringe.

I tre geni di tale famiglia, identificati nei mammiferi, codificano per tre proteine: Lunatic Fringe, Manic Fringe (MFng) e Radical Fringe. Sono delle  $\beta$ 1,3-N-acetilglucosaminiltransferasi che catalizzano l'aggiunta di residui di N-

acetilglucosamine finalizzate all'allungamento dei residui di O-fucosio nelle ripetizioni EGF-like.

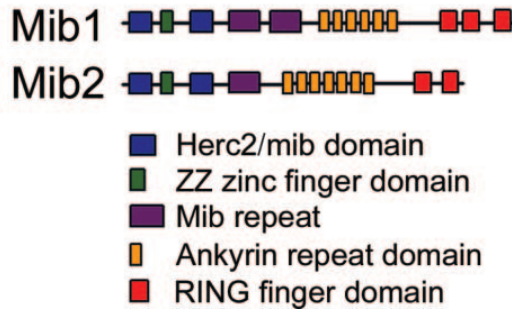
Il ruolo regolatorio svolto da questo meccanismo necessita ancora di delucidazioni, tuttavia si ipotizza una diversa capacità di questi ligandi di interagire con i recettori; infatti se queste modificazioni avvengono a carico dei recettori Delta si ha un aumento dell'interazione con i diversi recettori Notch, mentre se ciò avviene a carico dei recettori Jagged si ha una riduzione nell'affinità del suddetto legame. Inoltre importante potrebbe essere il ruolo svolto da questi eventi di glicosilazione nella multimerizzazione dei ligandi sulle cellule invianti il segnale. Ciò potrebbe coinvolgere delle lectine che riconoscendo i residui di O-fucosio sui ligandi DSL ne facilitano la multimerizzazione, evento che determina un'ampliamento dell'attivazione del signaling di Notch nelle cellule adiacenti (*Panin V.M. et al, 2002*).

Altro evento di modificazione a carico dei recettori che ne determina sia la loro espressione sulla superficie cellulare sia l'attivazione del signaling di Notch è l'ubiquitinazione.

Questo evento avviene in residui di Lys conservati nella porzione intracellulare dei ligandi all'estremità N-terminale. L'aggiunta di molecole di Ubiquitina avviene a carico di due diverse proteine: Mind bomb e Neur aventi ruolo di E3 ubiquitina ligasi.

Diversi studi di clonaggio e di mutazione in situ hanno permesso di identificare la struttura di queste proteine.

Mind bomb è una famiglia di proteine: Mib1 è espressa nei mammiferi, Mib2 è un suo parologo. Hanno un'identità del 36% nella sequenza aminoacidica. Mib2 è espressa nel cuore, nel cervello, nel fegato e nei polmoni. Mib1 è invece presente nei testicoli. Sono costituite da due domini Herc2/mib, due domini aventi un motivo zinc-finger, diverse ripetizioni Mib e ripetizioni di Ankirina e un o due domini RING. (*Koo B.K. et al.,2005a-b*);



<b>Mib1</b>	1	-----MVEGVGARVVRGPDWKWGDGEGGHVGTVRSFE-----SPEEVVVVVDNGT
<b>Mib2</b>	1	MDLDPHAGVQVGMRVVRGMDWKWGDGEGGHVGTVVELGRHGSPSTPDRVVVVDNGT
<b>Mib1</b>	48	AANYRC--SAYDTRILDSAPFGIKHDGTMCDTRQQPIISLRWKAECTNVLDLTVCYH
<b>Mib2</b>	61	RTNYRAGYQFAHDLILYDAAQIGIKRHPNITCDCKKKGRLRWRKCRVCFDYDLCHQCYH
<b>Mib1</b>	106	GDKHHRHRRYRIITPGSERVLTESRRKSKKITAARGIFAGARVVRGVDWQWEDQDGGNR
<b>Mib2</b>	121	HNKHDTHAEEERYEEMSHSRPVTLSPRQGLPRIPTLRGIFAGARVVRGVDWQWEDQDGGNR
<b>Mib1</b>	166	RERVTEHQDWSASSPFSAAVYLVWDNCAKNLYRVGFEGMSDLKCVQDAKGGFFYRDHCFVL
<b>Mib2</b>	181	TRVVDHVRGWDVETGRSVAISVFWADGTNTVTRVGHKGVDLRCVGEAAGGFYKREHLERK
<b>Mib1</b>	226	GE-----QNGNRNPGGLQIGDLVNIIDFDLEIVQSLCHGGGWFDMGPFETLTTGTVCGLD
<b>Mib2</b>	241	GRPAELQRRVSADGQPFRRGRDVKKCLLDTDVLDRMQEGHGGWTF-----S
<b>Mib1</b>	281	EDHDIVVQYPSGNRWTFNPAVLTKANIVRSQDAAQGAEGGTSQFQVSDLVQVCYDLERIR
<b>Mib2</b>	287	AERH-----N-----S-----FWQDVRVIQDLDTVK
<b>Mib1</b>	341	LQRGHGEWAEMLETGKQVGRVQQIYSDSDLKVEVCCTSWTYNPAAVSKVAPAGSAISN
<b>Mib2</b>	309	RQAGHGEWTDMDAELGRVGRVVKVFGDGNLRVAVGQRWFSPSCLVAYRPEEDANLD
<b>Mib1</b>	401	ASG-----ERLSQLLKKLFEFQESGDLNEELVKAANGDVAKVEDLLKRPDVDVNGCCA
<b>Mib2</b>	369	VAERARENKSSLSVALDKLRTQKSDPEHPGRLVVEAALGNVRAALDLLRRHPEQDITRNQ
<b>Mib1</b>	455	CHTAMQAAASQNGHVDILKLLKQNVVDEAEKEDRAVHHAAPGDEGAVISVLRHSADL
<b>Mib2</b>	429	GRPALQVAAYLQVVELVRLLLQARASMDLPDEENTVLMHTMGNQPEATRVLVLSAGCAV
<b>Mib1</b>	515	NARNKRROTPDHIAVNKGHLQVVKTLDFGCHPSHQDSEGDTPLDHAISKKR--DDILAV
<b>Mib2</b>	489	DARNGTRSRALHVAQRQEPLEVVKIICERGGDVNMPDAHADTFLHSAISAGAGASIVGV
<b>Mib1</b>	573	LEAG-ADVITNNGFNALHHAALRGNPFSAMRVLLSKLPREWIVDKKDDGYTALHLLA
<b>Mib2</b>	549	LEVPDI DVTA TNSQGF TL LH HASL RGHV LA VRKI LARAR--QLVDAKKDDGF TALHLLA
<b>Mib1</b>	632	LNNHVEVAELLVHQGNANLDIQNVNQQTALHLAVERQHTQIVRLLVRAGAKLDIQDKDGD
<b>Mib2</b>	607	LNNHREVAQVLIIRPGRCDVNVRNFKLQSPLEHLAVQQAHLGLVPLLVDPAGCSVNTDDEGD
<b>Mib1</b>	692	TPFHEALRHHTLSQRQLQDMQDVGVKVAWAPEPSKNTIMGLGTQGAKKSAASACFLA
<b>Mib2</b>	667	FALHVALQRHQLLPIVADRAGDPPGPLQLSRLQASGPPG-----CDELTVGAAVACFLA
<b>Mib1</b>	752	ANGADLSIRNKKGQSPDLDCPEPPLCKALAKCHKKVKVSGQVGSRSPSMISNDSETLEECM
<b>Mib2</b>	722	LEGADVSYANHRGRSPLDLATEGRVLLKALQGCQAQFRFRERQAAGGGGVPPGPRHVLSTPNT
<b>Mib1</b>	812	VCSDMKRDITLFGPCGHIAATCSLCSPRVKKCLICKEQVQSRTKIEEVVCSDKKAAVLFQF
<b>Mib2</b>	782	VFN-----LHVSGTAG-----PFAAEVVCSELAALLILESE
<b>Mib1</b>	872	CGHMCACENCA SLMKKCVQCRAVVERKVPFITCCGKSSDPSDEISSGNI PVLQKDKDN
<b>Mib2</b>	813	QHRTVCEECARRMKKCHRRCQVVISRKL-----RPDGE-----SBVVNAIQVPPPRQ---
<b>Mib1</b>	932	TNVNADVQKLCQQQLQDIKQTMCPVCLDRLKNMIFLCGHGTQICGDRMSKCPICRKAEE
<b>Mib2</b>	860	-----LVEEEQSRYRQMEERIICPICTDSHIRLVEQCCHGACAPCGAALNACPICRQPER
<b>Mib1</b>	992	RRIILLY-
<b>Mib2</b>	915	DRIQIFW

Koo B.K., Yoon K.J., Yoo K.W., Lim H.S., Song R., So J.H., Kim C.H., Kong Y.Y.  
*Mind Bomb-2 is an E3ligase for Notch ligand* J. Of Biological Chemistry 2005; 280: 23, 22335-22342

Anche Neur è una E3 ubiquitina ligasi. Sono note due Neur murine (Neur1 e 2) e una in *D. melanogaster* (DNeur). Sono costituite da domini con ripetizioni omologhe Neuralized (NHR) e un dominio RING finger.

```

DNeur      1  MGLSDIPANYMQGSHPHLLEHPQQQHHQHQHQLCHLQQMQQLHNAMPTPAQQAQVLAMESNELLMSTKDKLSSKKKMH
mNeur1    1  MGNFSSV-----SGLRGNPDRASRGHDMKADSIGG--FVPSHRCHHKQKHCFP-----
mNeur2    1  MGN-----FVHRRLPSSFFPRRLAATRFICYG----RGGERR

DNeur     81  LKKIKKRFGLVRRSPSSCPGPNLPELQFHSVHCDNTRISR.DGTLARRFBSFCRAITFSARFVRINERICVNFABISNN
mNeur1    52  -----TLSGGGLPAT--PPLFPHHTKGSGLMDLSHKAVKRQASFCNAITFSNRFPVVIYEQVRLRITKKQCCW
mNeur2    33  -----AVLGEAPR-----FHAQAKCKNVRDDGHSRRARFRNSFCNGVITTFQRPRRREYEQVRLRLVAVRPGW

DNeur    161  NCGHFRFFSNDDVTLEG-TLPKYACPDITNDEGFWAKALHDEQYCFRDNILYTVVNWAGDVIYGTNVEFKGVILTGEDFR
mNeur1   118  SGALRQPTSKKPPSRIFHPDLSLPKYACPDIVSDEGFWAKALPEEENEGNITLAWWAKRGRVYVRIINSSAAMPFSGTRVY
mNeur2    94  SGALRFGFTAHDFSLMSAQDIPKYACPDIVPECFWAKALPENLALRDTVLAWAKRHRGVYVRIINSSAAMPFSGTRVY

DNeur    240  SILWVVIDHYGNCTCHEELDSR-IYMYQQPAATPMNTPVAQQQMEQEPANSSALNSHHPHQSSRRSLFGHFAALEHD
mNeur1   198  DFLWALVDVYGHTRGVQLLDSSELVLDCTRRPSTALRRS----LECEADERRLSVSLCDLNVPGADGDDGAPPAQCP
mNeur2   174  GFLWALIDVYGHTRGVQLLRS--TFADPTLRLDGLQARLSA----CEPPGSHDAANFDNDRLNQVAVKLGHPALGRPD

DNeur    319  LERHYMPSLQSLHLAGNGGVSASVECAATAHDLANGTLPPERYNANGRLIPVPPFHNK-KGRNVRISODRPFVASRTESDFCQ
mNeur1   273  -----IPQNSLNSQHSRALPPALD-----GDLRPHALRAGAHVRLDEQTVARLEHGRDBR
mNeur2   248  AA-----VPCVARRRPRPASPALD-----ABLRPHATR-GPDVSLSADRRLACAPRPGGR

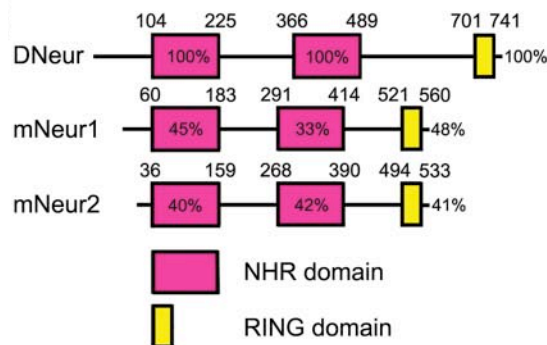
DNeur    398  SYVFTARPRRIGKRIWQVLKTEQMYVGAALAGLTSCLPAMLPDNLDPNDSDLLDRPEYVWVSKDIAAARQGGDETAEP
mNeur1   324  AVVFSRPVRVASTTFILNVRSSGGRAGALDFGVVTCDFGTLRPADLPPSPALVDKREYVAVGRVFGELSGDITGLV
mNeur2   300  PLVQSRFLRFGSSHCW-VGRFGLAFAFVAFGFSQDPPGLRSELPADPALDLRKEYVWVVAAR-GVPSGGDAISFA

DNeur    478  VADNGEVSSKNGFAVVMHVDQSLQLWAFLDVYGSTQ-SLRMFRQQLPNMVAVYSPQVNVNASSSSACNAASTRML
mNeur1   403  VNADGELHSHNGAAGMQLCVDASCPWMLFSLHGAIIT-QVRLGSLTMTERGGSDFCSFASPTSPSALGIRLSDPL
mNeur2   379  LRFGGDVLAVNGRFRGLLVCVDTSCALWAFFAVREGVAGQLRRLGL-TLQSS---SETMTSPSGSFGGDD--SDSDMT

DNeur    557  PMFESHSSNAGATAKLLHHPSQLSVAQSTSTLA-SAGGVNGSRMISHP-SNGDILQIQPNGGTTLVNVNLPFASSSHINDG
mNeur1   482  LSGCGSGPLGG-----SAGGTAFNSFVSLP-----SGVTPG----
mNeur2   452  FGVNQSSASE-----SGLVAPSSPSP-----VSPFAPFP--

DNeur    637  QLAARPTATVTS SGLVAGACSSGTLISTTSSQYIEQPIANS TNNAANKWEDSLSDQSDS SAE CTICYENPFDVHYMC
mNeur1   514  -----LGGWSDS CTICYEHAVDTVIYTC
mNeur2   487  -----TGRSNGE CTVCFDSRVDTVIYTC

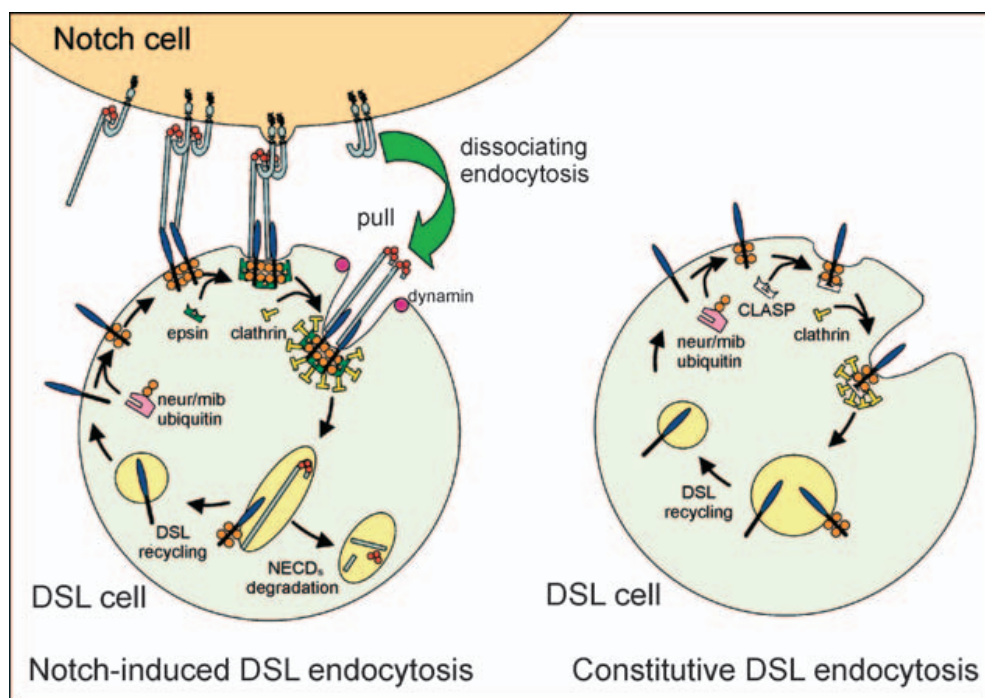
DNeur    717  GHMCLCYDCAIQWAGVGGGQCPFCFAVREVDVIRYTT
mNeur1   537  GHMCLCYSCGLRLKALH-ACCPICRRPIKDIKIVRSS
mNeur2   510  GHMCLCHGCGRLRLRQAR-ACCPICRRPIKDVIRIYRP
    
```



Song R, Koo B.K., Yoon K.J., Yoon M.J., Yoo K.W., Kim H.T., Oh H.J., Kim Y.Y., Han J.K., Kim C.H.K., Kong Y.Y. *Neuralized-2 regulates a Notch ligand in cooperation with Mind Bomb-1* J. Of Biological Chemistry 2006; 281: 47, 36391-36400

Minb e Neur , ubiquitinando i ligandi deternimano la loro internalizzazione in vescicole di endocitosi, controllandone il trafficking: tali vescicole possono essere indirizzate al proteo soma(se poliubiquitinate) o possono essere riciclate in

superficie per esporli nuovamente ai recettori(se monoubiquitinate) (Weinmaster G. et al., 2008). Tale endocitosi costituiva dei ligandi DSL è accompagnata da un evento analogo Notch-dipendente, in cui la monoubiquitinazione dei ligandi uniti al recettore richiama al disotto della membrana plasmatica l'epsina, che legando le molecole di ubiquitina determinerà una loro stabilizzazione, favorendo la formazione di "cluster" di tali ligandi e la loro successiva endocitosi. Ciò darà origine alla formazione di una forte trazione alla base della dissociazione non proteolitica del NECD in maniera ligando-dipendente. (Weinmaster G. et al.,2007).



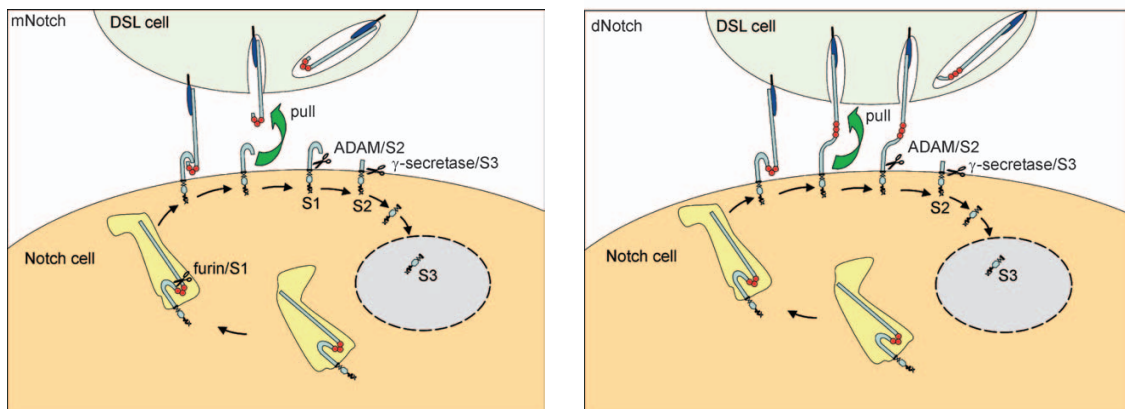
Nichols J.T., Miyamoto A., Weinmaster G. *Notch signaling-Constantly on the move* Traffic 2007; 8: 959-969

L'evento di endocitosi dei ligandi di Notch è un evento estremamente delicato poiché determina il destino di questi.

Può avvenire semplicemente per determinare un riciclo dei ligandi dalla superficie cellulare oppure per indirizzarli in altri microdistretti della membrana plasmatica, in

quanto un overespressione di tali ligandi determinerebbe una inibizione del signaling di Notch.

Il ruolo sicuramente più importante è mediare l'attivazione del signaling di Notch. Ciò avviene mediante il processo di internalizzazione del ligando unito al recettore nella cellula presentante il segnale. Si ha così un cambiamento conformazionale nel recettore Notch che sarà in grado di esporre il suo sito di clivaggio S2 all'azione delle metalloproteasi. Successivamente la trans-endocitosi del NECD unito al ligando faciliterà l'esposizione del secondo sito di taglio S3 da parte delle  $\gamma$ -secretasi con la liberazione del NICD, che migrando nel nucleo attiverà geni target. (Weinmaster G. et al.,2007)



Nichols J.T., Miyamoto A., Weinmaster G. *Notch signaling-Costantly on th move Traffic* 2007; 8: 959-969

## 5. Interazione tra i recettori Notch e i ligandi DSL: Notch3 e Jagged1

La comprensione del meccanismo di attivazione del signaling di Notch risultò dall'interazione tra i membri della famiglia dei recettori Notch e i ligandi canonici DSL è stata da tempo oggetto di studio.

In due distinti lavori, Hirai H. e collaboratori sono riusciti a delucidare, tramite studi di saggi di "binding" cellulare e saggi mutazionali condotti *in vitro*, l'effettiva capacità dei membri della famiglia dei recettori Notch di legare i diversi ligandi DSL con diversa efficienza e specificità.

Hirai H. e collaboratori hanno evidenziato prevalentemente la capacità dei recettori Notch1 e Notch3 di legare indistintamente tre rappresentanti della famiglia dei ligandi DSL: Delta1, Jagged1 e Jagged2.

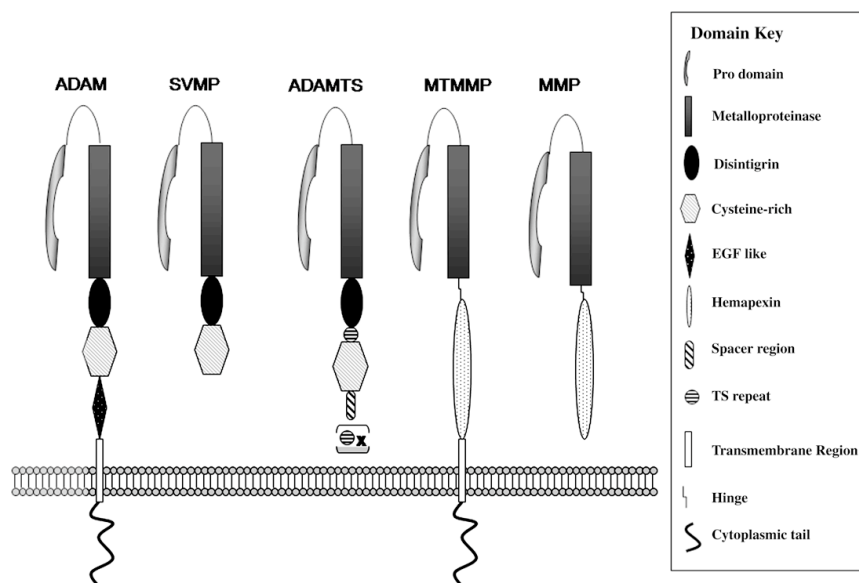
Hanno inoltre osservato, in presenza di  $Ca^{2+}$ , che la forma solubile di Jagged1 può interagire con i diversi recettori Notch, ma è stata osservata una più alta affinità per Notch3 (*Shumizu K, et al, 2002*).

Con gli studi di mutanti per delezione dei ligandi, prevalentemente di Jagged1, solubile e transmembrana, hanno, in aggiunta, dimostrato l'importanza del dominio DSL come unità minima e sufficiente a garantire il legame ligando-recettore. Inoltre hanno compreso l'importanza delle ripetizioni EGF-like 1 e 4 nello stabilire il legame formando complessi ad alta affinità in presenza di  $Ca^{2+}$  (*Shimizu K. et al., 1999 e 2000*).

### 5.1. Le metalloproteinasi: ADAM

Con il termine Adam (**a** disintegrin **and** metalloproteinase) si fa riferimento ad una famiglia di proteine transmembrana e solubili di circa 750 aminoacidi di lunghezza, aventi molteplici funzioni regolatorie.

ADAMs, SVMPs (snake venom metalloproteinase) e ADAMTs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) appartengono alla medesima famiglia di proteine secondo la classificazione MEROPS: M12B (adamalysin protease). Nella struttura e nei ruoli sono altamente omologhe alle metalloproteinasi (MMP) e alle metalloproteinasi transmembrana (MTMMP).



Edwards D.R., Handsley M.M., Pennintong C.J., *The ADAM metalloproteinases* Molecular Aspects of medicine 2008; 29: 258-289

Le proteine appartenenti alla famiglia di metalloproteinasi (MP) Sono sintetizzate come zimogeni, che andranno incontro ad un processo di attivazione, durante la transizione nel Golgi, che vedrà l'allontanamento di un prodominio dall'N-terminale ad opera di enzimi convertasi o in modo autocatalitico (ADAM8e 28).

La presenza del prodominio garantisce l'inattivazione della proteina. Ciò è reso possibile dalla sequenza aminoacidica PKVCGVPD in cui il residuo cisteinico andrà a legare il residuo di zinco nel sito catalitico della proteina inibendo la sua attività. In altri casi, per alcune metalloproteasi quali ADAM17, il prodominio può fungere da chaperone o può proteggere la proteina dalla degradazione.



Al C-terminale del prodominio di tutte le metalloproteinasi è presente un dominio costante contenente un motivo consenso (**HEXGHXXGXXHD**), il cui ruolo è quello di coordinare il legame tra lo zinco e un residuo di His per creare il sito attivo dell'enzima.

Partendo dall'estremità C-terminale di questo dominio l'organizzazione strutturale di tale famiglia di proteine diverge significativamente.

ADAMs, SVMPs e ADAMTs, sono caratterizzate dalla presenza di un residuo di disintegrina formato da 14 aminoacidi (*disintegrin loop*) coinvolto nell'interazione tra ADAMs e le integrine e da un residuo cisteinico.

Inoltre, le proteine ADAMs contengono un dominio con ripetizioni EGF-like (assente in ADAM10 e 17), seguite da una coda citoplasmatica che varia in lunghezza tra i vari membri della famiglia. Tale regione intracitoplasmatica è coinvolta nell'attivazione di numerosi signaling e nel garantire la corretta architettura citoscheletrica delle cellule poiché interagisce con diverse proteine. Inoltre è dotata di molteplici motivi ricchi in prolina che determinano la loro capacità di agire come ligandi per proteine contenenti il dominio SH2 e SH3.

Ad oggi si conoscono circa 38 membri, classificati da diversi organismi, appartenenti alla famiglia proteica ADAMs, di cui solo 13, nell'uomo, sembrano avere un ruolo come metalloproteasi su diversi substrati (*Edwards D.R. et al., 2008*).

Per quanto concerne i geni codificanti per queste proteine è stata notificata un'elevata variabilità: il genoma umano contiene 25 geni e 4 pseudogeni, il topo 37 e il ratto 34.

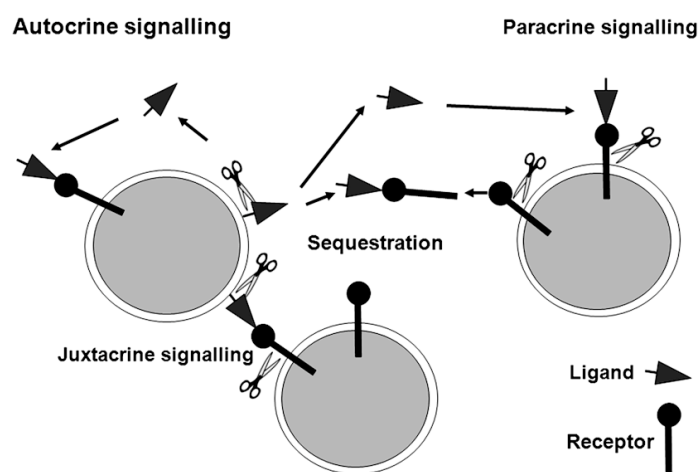
Come per tutte le MP anche per i membri della famiglia ADAM i meccanismi regolatori coinvolgono il reclutamento di TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), proteine che sono in grado di formare complessi non covalenti nel rapporto 1:1 con l'enzima attivo ne inibiscono l'attività (*Baker et al.,*

2002). Tali proteine possono, inoltre, essere regolate da molteplici eventi di modificazione a carico della coda intracitoplasmatica, come ad esempio la fosforilazione da parte di PKC che la rendono attiva (*Diaz-rodriguez et al.*, 2002).

Le proteine ADAM sono coinvolte in numerosi signaling durante gli eventi di spermatogenesi, miogenesi, neurogenesi, osteogenesi, di sviluppo del sistema immunitario e di tumorigenesi.

Ciò è reso possibile dalla capacità di tali proteine di influenzare l'attivazione di vie di segnalazione intracellulari in modo paracrino, autocrino, e juxtacrino, agendo sia su ligandi sia su recettori. Infatti, le metalloproteinasi ADAM sono in grado di:

- i. Attivare i ligandi che agiscono su recettori di membrana in modo autocrino e paracrino
- ii. Attivare proteoliticamente i ligandi che rimangono associati alla membrana; questi vanno ad agire in modo autocrino e juxtacrino
- iii. Determinare l'allontanamento di un frammento extracellulare derivante dal processamento del ligando ("shedding"), inibendo la via di trasduzione del segnale sulle cellule esprimenti i recettori e/o attivandolo sulle cellule esprimenti i ligandi (*Edwards D.R. et al.*, 2008).

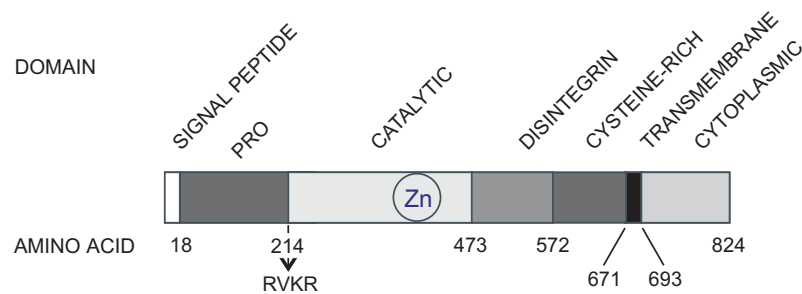


**Edwards D.R., Handsley M.M., Pennintong C.J.,** *The ADAM metalloproteinases*  
Molecular Aspects of medicine 2008; 29: 258-289

### 5.1.1 ADAM17/TACE

Adam17 o TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme) è la prima metalloproteinasi meglio studiata e descritta.

È codificata da un gene di circa 50 kb costituito da 19 esoni, localizzato sul cromosoma umano 2p25 e sul cromosoma murino 12. Il trascritto di tale gene andrà incontro a splicing alternativo che genererà due trascritti maturi. L'isoforma più corta è priva del segmento codificante per la coda citoplasmatica (Ceretti *et al.*, 1999).



Mezyk R., Bzowska M., Bereta J., *Structure and functions of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* Acta Biochim. Pol 2003; 50: 625-645

È una proteina trans membrana di tipo I sintetizzata come uno zimogeno. Il prodominio funge da inibitore dell'attivazione di tale proteina immatura tramite il legame tra il residuo di Cys del dominio PKCGVPD e lo zinco nel sito catalitico. L'allontanamento del prodominio durante la maturazione avviene ad opera di convertasi che riconoscono il sito di clivaggio furinico RVKR localizzato tra il prodominio e il sito catalitico.

La formazione del sito attivo avviene ad opera del legame tra lo zinco nel motivo **HELGHNFGAEHD** e residui di His all'interno del sito catalitico (Black *et al.*, 1997).

Molteplici sono i substrati di TACE noti, sostanzialmente divisi in due gruppi:

Development and differentiation	Immune system	Other
TGF $\alpha$	TNF $\alpha$	APP
HB-EGF	TNF-RI	PrP <sup>c</sup> *
amphiregulin	TNF-RII	MUC1
neuregulins	IL1-RII	
TrkA	L-selectin	
HER4 JM-a	fractalkine	
GH-R*	IL6-R $\alpha$ *	
Notch	M-CSF-R*	
TRANCE*	TRANCE*	

**Mezyk R., Bzowska M., Bereta J.,** *Structure and functions of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* Acta Biochim. Pol 2003; 50: 625-645

- i. Substrati coinvolti nel processo di sviluppo e differenziazione agendo sia su ligandi sia su recettori:

TACE può indurre il processamento e il rilascio del dominio extracellulare o ectodominio di alcuni dei ligandi del recettore EGF (EGFR), sintetizzati come proteine trans membrana (TGF- $\alpha$ , EGF, amfiregulina, neuregulina e TRANCE). Ciò avviene inseguito alla fosforilazione della coda intracitoplasmatica di TACE da parte di chinasi attivate da agonisti di recettori associati alle proteine G (GPCR) (*Ohtsu H. et al., 2005*).

TACE può anche mediare il rilasciamento del dominio extracellulare di alcuni recettori coinvolti negli eventi di sviluppo e differenziazione, quali il recettore dell'ormone della crescita (GHR) e il suo dominio extracellulare (GHRB, growth hormone binding protein) andrà a legare con maggiore

affinità l'ormone GH inibendo la sua disponibilità nel legare il recettore (*Zhang et al., 2000*); può agire sul recettore Notch in un processo noto come RIP (regulated intramembrane proteolysis) in cui il clivaggio del frammento extracellulare esporrà il recettore al secondo clivaggio intracitoplasmatico da parte delle  $\gamma$ -secretasi responsabili della formazione del NICD che migrando nel nucleo attiverà i geni bersaglio coinvolti nei processi di sviluppo e differenziazione (*Bray et al., 2000*)).

- ii. Substrati coinvolti nella regolazione del sistema immunitario: la proteina ADAM17/TACE può agire sia su citochine, come nel caso del TNF- $\alpha$ , presente in due forme: transmembrana e solubile, quest'ultima derivante dall'azione di TACE sul primo. Il TNF- $\alpha$  solubile è coinvolto negli effetti sistemici provocati da questa citochina pro-infiammatoria, quale shock settico, sia sui loro recettori: l'azione di TACE sul TNF-RI libererà il dominio extracellulare di questo responsabile della sindrome auto infiammatoria familiare, malattia genetica caratterizzata dall'indebolimento della porzione extracitoplasmatica del TNF-RI (*McDermott et al., 1999*).

Può agire anche sulle molecole responsabili dell'adesione cellulare, come ad esempio nel caso delle L-selectine, glicoproteine espresse sulla superficie di molti leucociti. TACE può indurre il rilascio del dominio extracellulare delle L-selectine danneggiando il fenomeno della localizzazione e/o della migrazione di questi ai siti d'infiammazione (*Ferri et al., 2002*); d'altra parte tale fenomeno può rappresentare un meccanismo protettivo durante gli esenti di sepsi (*Seidelin et al., 2002*)

- iii. Altri ruoli di Adam17 ancora poco noti e non possono classificarsi nei precedenti (*Mezyk R. et al., 2003*).

## 5.2. Il processamento dei ligandi DSL

Recentemente è stato proposto un meccanismo di processamento dei ligandi DSL analogamente a quanto avviene nei recettori della famiglia Notch. Ciò deriva da osservazioni strutturali che evidenziano una forte omologia tra ligandi e recettori (*Qi H.*, 1999, *Selkoe D.J.*, 2003).

Gli eventi di processamento hanno inizio successivamente al legame tra Notch e i ligandi Delta e Jagged1. Quest'ultimi vengono processati dalla metalloproteinasi ADAM17, l'enzima in grado di effettuare un taglio nella porzione extracellulare del ligando e di determinare il rilasciamento ("shedding") di un frammento solubile del ligando (DECD e JECD) che è in grado di attivare la trasduzione del segnale di Notch nelle cellule adiacenti (*Shimizu K. et al.*, 1999 e 2000). In particolare è stato dimostrato che cellule esprimenti in modo costitutivo il ligando Jagged1 sono in grado di rilasciare nel mezzo di coltura un'elevata quantità di JECD e che tali forme solubili possono legare i recettori Notch, con più alta affinità per Notch3 (*Shimizu K. et al.*, 1999 e 2000) e possono avere una funzione biologica (*V-Finney et al.*, 1998). Inoltre la forma solubile del ligando è responsabile della clusterizzazione dei ligandi sulla superficie delle cellule inviando il segnale in modo da garantire l'attivazione del signaling a valle. Il rilasciamento della regione extracellulare del ligando, determinerà la formazione di un frammento associato alla membrana (CTF1). La metalloproteinasi ADAM17 oltre a determinare il rilasciamento del frammento solubile (DECD o JECD) determina anche una modificazione strutturale del ligando tale che la porzione transmembrana (CTF1) va incontro ad un successivo clivaggio da parte della PS/ $\gamma$ -secretasi generando un dominio intracitoplasmatico (DICD e JICD o CTF2) che potrà traslocare nel nucleo (*La Voie M.J., Selkoe D.J.*, 2003).

Il CTF2 può migrare nel nucleo grazie alla presenza del dominio NSL nella sua porzione C-terminale. Qui può attivare alcuni geni bersaglio, probabilmente attraverso l'attivazione di un fattore di trascrizione AP1 (*La Voie M.J. et al., 2003*). Inoltre interessante è anche l'osservazione che il dominio intracellulare di Jagged1 è in grado di aumentare sia l'espressione di Jagged1 stesso sia del recettore Notch3 (*Ascano et al., 2003*).

Tale funzione del frammento JICD deriva dalla presenza di un dominio di circa 6 aminoacidi: RMEYIV che costruiscono il PDZ-ligando in grado di legare con elevata affinità le proteine aventi un dominio PDZ. Nota, ad esempio, è interazione tra JICD e la proteina Ras AF6 (*Ascano J.M. et al., 2003*).

Inoltre è stato dimostrato che il dominio PDZ-ligando in Jagged1 è responsabile dei processi di trasformazione neoplastica osservati in cellule esprimenti in modo stabile il ligando Jagged1 (*Ascano J.M. et al., 2003*).

L'insieme di tali osservazioni hanno permesso, recentemente, di ipotizzare un modello bi-direzionale di segnalazione delle proteine DSL. Tale modello prevede che le proteine DSL possano svolgere due funzioni distinte: attivare la via di trasduzione del segnale dei recettori Notch in cellule adiacenti e innescare i meccanismi di segnalazione dei ligandi in particolare Jagged1 (CTF1o JICD), attraverso il dominio PDZ-ligando, nelle cellule esprimenti i lagandi. Tali meccanismi di segnalazione intrinseci alla cellula possono in parte essere responsabili dei processi di tumorigenesi (*Ascano J.M. et al., 2003*).

A riguardo assumono un notevole impatto dati di letteratura che dimostrano il ruolo dell'interazione Notch3/Jagged1 nello sviluppo di

neoplasie in diversi distretti anatomici, ovaio (*Choi J.H. et al., 2008*) e polmone (*Konishi J. et al., 2007*)



## Parte sperimentale

### 1. Scopo del lavoro

È stato precedentemente dimostrato che l'attivazione costitutiva del "signaling" di Notch3, nel topo transgenico Notch3-IC, induce un aumento di espressione persistente della catena pT $\alpha$  del pre-TCR in tutte le sottopopolazioni timocitarie e che tale over-espressione caratterizza la leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL), che si sviluppa in tale modello animale. Il topo transgenico Notch3-IC (tg) ricorda come decorso clinico la leucemia T-ALL umana, caratteristica dell'età pediatrica. A sostegno di ciò, il 100% delle T-ALL umane, da noi analizzate, è caratterizzato da una over-espressione combinata di Notch3 e di pT $\alpha$ , il cui livello di espressione si riduce drasticamente in tutti i pazienti analizzati in fase di remissione. Tali studi hanno messo in evidenza che la cooperazione tra Notch3 e pT $\alpha$  è essenziale per il processo di trasformazione neoplastica che porta allo sviluppo della leucemia a cellule T (*Bellavia D. et al., 1999*).

L'attivazione del signaling di Notch3 si ha in seguito al legame specifico recettore/ligando. Tale interazione innesca una serie di eventi proteolitici nelle proteine Notch, necessari per l'attivazione del recettore e caratterizzati dal clivaggio di un dominio intracellulare Notch-IC in grado di traslocare nel nucleo e di influenzare la regolazione trascrizionale di numerosi geni bersaglio (Hes1 e pT $\alpha$ ) (*Bellavia D. et al., 1999*).

Le proteine della famiglia DSL (Jagged1 e 2 e Delta1, 3 e 4), sono state identificate inizialmente come i ligandi specifici dei recettori transmembrana appartenenti alla famiglia Notch (Notch1, 2 e 3), presenti in cellule adiacenti a quelle esprimenti il ligando. Inoltre, è stata dimostrata

la differenziale affinità di legame ai recettori per i diversi membri della famiglia DSL; ed in particolare Jagged1 sembra avere una maggiore affinità di legame con il recettore Notch3 (Shimizu K., 1999).

Jagged1 è un membro della famiglia di proteine Delta/Serrate/Lag-2 (DSL). I geni DSL codificano per proteine di tipo I trans-membrana, caratterizzate da un dominio extracellulare costituito da sequenze multiple conservate di tipo EGF, e da un dominio conservato di tipo DSL ricco in residui di cisteina. Il dominio intracellulare varia in lunghezza e non è conservato tra i vari membri della famiglia DSL.

Solo di recente, è stato messo in evidenza un signalling bidirezionale che coinvolge, non solo la cellula esprime il recettore Notch, ma anche la cellula esprime il ligando specifico, Jagged1, che sembra essere in grado di innescare una intrinseca cascata di trasduzione del segnale (Ascano et al., 2003). E' stato dimostrato, infatti, che il dominio extracellulare è substrato dell'azione delle metalloproteinasi ADAM 17, che determina la liberazione di un frammento extracitoplasmatico identificabile nel mezzo di coltura (Selkoe et al., 2003). Inoltre, la componente intracellulare di Jagged1 va incontro a tagli proteolitici gamma-secretasi dipendenti, che gli permettono di liberarsi dalla porzione transmembrana e di trasferirsi nel nucleo, dove è in grado di regolare la trascrizione di geni specifici. In particolare, è stato osservato che tale dominio intracellulare è in grado di controllare l'espressione genica sia di Jagged1 stesso che del recettore Notch3 (Ascano et al., 2003).

Il dominio intracellulare di Jagged1 comprende una regione "PDZ-ligand" che è stata dimostrata essere essenziale nella trasformazione neoplastica *in vitro* (Selkoe et al., 2003; Ascano et al., 2003).

Recentemente è stato, inoltre, dimostrato che l'alterata espressione dei ligandi Jagged1 e Delta1, nonché la specifica interazione ligando/recettore (Jagged1/Notch3) è strettamente correlata con l'insorgenza di tumori solidi all'ovaio (*Jung-Hye Choi et al., 2008*) e al polmone (*Junkonishi et al., 2007*).

In esperimenti preliminari abbiamo osservato l'esistenza di una cis-espressione di Notch3 e del suo ligando Jagged1 sia in timociti N3-232T, una linea cellulare stabilizzata derivante dal topo transgenico Notch3-IC, che in timociti e linfociti T analizzati *ex-vivo*. Inoltre, abbiamo osservato che il ligando Jagged1, espresso nei timociti derivanti dal modello murino transgenico Notch3-IC (tg), presenta la capacità di andare incontro ad un processamento costitutivo, evento di significativa importanza in quanto i frammenti Jag1-ECD e Jag1-ICD liberati, sia nell'ambiente extracellulare che nella regione intracellulare rispettivamente, potrebbero svolgere un ruolo determinante nella progressione della T-ALL, indotta dalla costitutiva espressione di Notch3-IC. Per tale ragione abbiamo ipotizzato l'esistenza di una specifica cooperazione tra Notch3 e Jagged1 nel sostenere/potenziare il processo di trasformazione neoplastica della T-ALL indotta da Notch3. Sulla base di tali osservazioni, lo scopo di questa tesi è stato di identificare il meccanismo molecolare che potrebbe spiegare in che modo il ligando Jagged1, espresso all'interno della stessa cellula esprime il recettore, potrebbe sostenere la via oncogènica di Notch3 e determinare la progressione della T-ALL. In particolare, abbiamo definito il ruolo dei frammenti solubili: Jagged1 extracellulare (ECD) e carbossi-terminale (Jagged1 ICD) nell'amplificare e/o sostenere il signaling del recettore Notch3 in modo autocrino e paracrino.

## **2. Materiali e Metodi**

### **2.1 Modello murino utilizzato: topo transgenico Notch3-IC**

La generazione e la tipizzazione fenotipica del topo transgenico Notch3-IC è descritto nella referenza Bellavia D. et al., 2000.

### **2.2 Recupero dei linfociti dal timo**

Il timo è prelevato dai topi sacrificati per dislocazione cervicale. I timi, privati della capsula connettivale e dei capillari sanguigni, sono stati sminuzzati e filtrati fino ad ottenere una sospensione cellulare in terreno DMEM al fine di recuperare la componente linfocitaria. La sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta a due lavaggi successivi in terreno DMEM mediante centrifugazione a 1250 rpm per 7 minuti a +4°C.

### **2.3 Analisi citofluorimetrica**

I timociti sono stati lavati in tampone fosfato freddo (PBS 1x), incubati per 15 minuti a +4°C con gli anticorpi specifici coniugati con fluorescina tiocianato (FITC) o ficoeritrina (PE) e lavati nuovamente in PBS 1x freddo per eliminare l'anticorpo non legato. Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali anti-CD4-FITC (H-129.19), anti-CD8a-PE (53-6.7) ed anti-CD69-FITC (H1.2F3) (BD, PharMingen); i campioni sono stati successivamente acquisiti al citofluorimetro FACSscan (Becton Dickinson) ed analizzati mediante il programma CellQuest (Becton Dickinson). Le cellule morte sono state escluse dall'analisi mediante un'opportuna selezione dei parametri fisici di dimensione e granulosità (rispettivamente, 'forward-scatter' e 'side-scatter').

## 2.4 Preparazione degli estratti proteici totali e frazionati da cellule in vitro ed ex-vivo

I linfociti isolati dal timo o le cellule in coltura vengono lavati in tampone fosfato freddo (PBS 1x), quindi raccolti mediante centrifugazione a 1250 rpm, a +4°C, per 10 minuti. Successivamente vengono risospesi in un tampone di lisi contenente Tris HCl 20mM pH 7.5, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, EDTA 1mM pH 8, NaF 30mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM e lasciati in incubazione 45 minuti a +4°C.

Al termine dell'incubazione il lisato viene centrifugato a 13000 rpm per 15 minuti, a +4°C, per poi recuperarne il supernatante. L'estratto proteico ottenuto viene quindi quantizzato secondo il metodo Bradford (Biorad).

Per la preparazione degli estratti proteici frazionati: nucleo e citoplasma si procede con l'isolamento delle cellule dal timo di diversi topi vengono lavate in tampone PBS 1x freddo, quindi raccolte mediante centrifugazione a 1250 rpm, a +4°C, per 10 minuti. Successivamente vengono risospese in 10 volumi di buffer A ipotonico (10mM Hepes, pH=7; 10mM KCl; 10mM NaCl; 0.1mM EDTA; 0.1mM EGTA; 1mM DTT; 0.5mM PMSF) e lasciate in ghiaccio per 15 minuti, al fine di promuovere la rottura della membrana plasmatica. Le cellule vengono quindi lisate mediante l'aggiunta di NP40 (octylphenoxypolyrthoxyethanol; SIGMA) allo 0.6%, miscelando il tutto accuratamente. La separazione dei nuclei dal citosol viene effettuata mediante centrifugazione a 12000 rpm per 30 secondi a +4°C: i nuclei, di peso superiore, si concentreranno sul fondo della provetta, mentre le proteine del citosol, più leggere, rimarranno nel sopranatante, accuratamente prelevato.

Si prosegue per recuperare le proteine nucleari: il pellet ottenuto dalla centrifugazione precedente è lavato con 400 µl di buffer A contenente lo 0.6% di NP40; segue un'ulteriore centrifugazione a 12000rpm per 30 secondi ed un successivo lavaggio in 100ml di buffer C (20mM Hepes, pH=7.9; 0.4M NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM DTT; 1mM PMSF). Al fine di provocare la rottura della membrana nucleare e consentire la fuoriuscita delle corrispondenti proteine, la sospensione cellulare ottenuta è energicamente agitata per 15 secondi ed incubata a +4°C per 10 minuti: questa operazione viene ripetuta per tre volte. Gli estratti nucleari sono infine ottenuti recuperando il soprannatante dopo centrifugazione a 12000rpm per 20 minuti a +4°C.

Le proteine vengono quindi quantizzate secondo il metodo Bradford (Biorad).

## **2.5 Saggio di western blott**

Gli estratti proteici, precedentemente denaturati a 95°C per 10 minuti per garantirne la distensione strutturale e quindi facilitarne la corsa elettroforetica, vengono quindi separati su un gel di acrilamide a diversa percentuale a seconda della proteina d'interesse (al 10% per ADAM17, al 4-12% per Jagged1 e all'8% per Notch3), in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), trasferiti su filtro di nitrocellulosa e successivamente incubati con l'anticorpo primario. Gli anticorpi utilizzati sono Jagged1 C-20, Jagged1 ab7771 (abcam), Notch3 M-20 e C-20 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e ADAM17 ab2051 (Abcam). Come controllo interno della quantità di proteina utilizzata per ogni campione è stato utilizzato l'anticorpo anti-β tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti Lck (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e anti-β actina (Santa Cruz

Biotechnology, Inc.),. La rivelazione degli anticorpi specifici è stata ottenuta con l'uso di anticorpi secondari perossidati e mediante reazione di chemiluminescenza (ECL, Pierce).

## 2.6 Linee cellulari

Esperimenti di trasfezione transiente sono stati eseguiti utilizzando le linee cellulari pre-T 2017, timociti immaturi immortalizzati allo stato differenziativo DNIII (*Spolski R. et al.*, 1988), e Hek293 (gentilmente concesse dal Prof U. Lendhal, Stoccolma). Le linee cellulari pre-T 2017 sono state tenute in coltura in terreno RPMI supplementato con FBS 10%, Glutamina 1%, Antibiotici (Penicillina e Streptomicina) 2% e b-mercaptoetanolo 0,28mM. Mentre le linee cellulari Hek 293 sono state tenute in coltura in terreno DMEM supplementato con FBS 10%, Glutamina 1% e Antibiotici (Penicillina e Streptomicina) 2% .

Gli esperimenti di analisi endogena sono stati effettuati sulla line cellulare N3- 232T, timociti immaturi derivanti dal topo transgenico per il dominio intracitoplasmatico Notch3-IC (*Bellavia e al.*, 2000), mantenute in coltura in terreno RPMI supplementato con FBS 10%, Glutamina 1%, Antibiotici (Penicillina e Streptomicina) 2%, Hepes Buffer 10mM e b-mercaptoetanolo 0,28mM. I saggi di cocoltura in presenza di medium di coltura condizionato sono stati effettuati utilizzando la linea cellulare SCB29 (*Aifantis et al.*, 2001), timociti immaturi caratterizzati dalla presenza del complesso del pre-TCR sulla membrana cellulare poiché derivate dalle SCIET27, trasfettate stabilmente con la catena b del TCR.

## 2.7 Trattamenti cellulari

La linea cellulare pre-T 2017 è stata sottoposta ad alcuni trattamenti farmacologici specifici, utilizzando inibitori delle  $\gamma$ -secretasi (GSI-Calbiochem) alla concentrazione di 5 $\mu$ M per 12 ore e TAPI2 , inibitore delle metalloproteinasi ADAM17 alla concentrazione di 5 $\mu$ M per 12 ore, aggiunte al mezzo di coltura. La linea cellulare N3-232T è stata sottoposta ad alcuni trattamenti farmacologici specifici, utilizzando inibitori della formazione dei raft lipidici di membrana MbCD (Sigma) alle concentrazione 10mM per 20' a 37°C aggiunta al mezzo di coltura. Le cellule sono state successivamente processate.

## 2.8 Plasmidi

I plasmidi di fusione: i promotori d'interesse sono stati inseriti in plasmidi contenenti il gene reporter della luciferasi. I frammenti dei promotori sono stati costruiti tramite amplificazione iniziale della sequenza genica utilizzando primers specifici: promotore di pT $\alpha$  full-length (5'-GCTTTGGATCTGGAGGATGA-3' e 5'-CTCTGCTAGTCTGCCTCCCA-3'). I vettori di espressione usati sono descritti in letteratura : Notch3-IC e Notch1-IC (Bellavia D. et al. 2000), RBP-JK e RBP-Jk R218H (Chung C.N. et al., 1994) e MAML1 (Wu L. et al., 2000). I vettori di espressione pBABe Jagged1 IC, pBABE Jagged1 TMIC e pBABE Jagged1 FL sono stati gentilmente concessi dal Dott. Capobianco A.J.).



## 2.9 Clonaggio

Per i saggi di luciferasi sono stati utilizzati i promotori Jagged1<sup>-3794/-2156</sup> (Jag1<sup>-3794/-3281</sup> luc) e Jagged1<sup>-1351/-237</sup> (Jag1<sup>-1351/-237</sup> luc). Entrambi sono stati costruiti mediante l'amplificazione iniziale della sequenza genica di interesse utilizzando i primers specifici: per Jagged1<sup>-3794/-2156</sup> 5'- ATCTCCTTCTCCCATCTCCT-3' e 5'- GGACTTCTTACCTGCATCTC-3'; per Jagged1<sup>-1351/-237</sup> 5'- GATTATGACCAGGAGTGTCTG -3' e 5'- AGGGAGGGGAGGAAAAAAA-3'. Successivamente sono stati inseriti all'interno del vettore pGL3-basic vector mediante doppia digestione enzimatica rispettivamente con Bgl2 e Mlu1 e con Bgl2 e Sac1.

Il promotore Jagged1<sup>-1351/-237</sup> è stato sottoposto a mutagenesi puntiforme nella sequenza genica di interesse, specifiche per il sito di legame delle proteine CSL/RBP-Jk comprese tra -997/-991bp, utilizzando il Kit di mutagenesi QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)

## 2.10 Transfezioni cellulari e saggi di luciferasi

La transfezione delle linee cellulari pre-T 2017 ed Hek 293 è stata effettuata tramite il kit 'Lipofectamine 2000' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) secondo il protocollo specifico. Sono state incubate 4x10<sup>5</sup> cellule per pozzetto a 37°C in piastre da 24 pozzetti, in terreno privo di antibiotici.

Gli esperimenti di transfezione sono stati effettuati cotransfettando 0,2µg di un plasmide 'reporter' per pTα (pTα luc), Jagged1<sup>-3794/-3281</sup> (Jag1<sup>-3794/-3281</sup> luc), Jagged1<sup>-3794/-3281</sup> mutato nel sito RBP-Jk/CSL<sup>-3448/-3442</sup> (Jagged1<sup>-3794/-3281</sup> CSL1 MUT luc) e Jagged1<sup>-3794/-3281</sup> mutato nel

sito RBP-Jk/CSL<sup>-3275/-3281</sup> (Jagged1<sup>-3794/-3281</sup> CSL2 MUT luc) in presenza ed in assenza del complesso di attivazione descritto in Bellavia et al., 2000. La quantità totale del DNA trasfettata è stata mantenuta costante in ogni punto di trasfezione tramite l'aggiunta del vettore vuoto pcDNA3.1. Il vettore 'reporter' Renilla luciferasi pTk-Renilla-Luc (0,5ng) è stato incorporato in ciascuna trasfezione (Promega, Madison, WI) per valutare l'efficienza di questa. Le cellule sono state lisate in tampone (100µl/pozzetto) (Lysis Buffer, Promega) 24h dopo la trasfezione. L'attività luciferasica derivata dalla Renilla è stata quantizzata in ogni campione con il "Dual luciferase Assay System" (Promega), usando come luminometro Perkin Elmer. L'emissione di luce è stata misurata per 2 secondi dopo l'iniezione. L'attività luciferasica specifica per i vari geni 'reporter' è stata determinata su un triplicato di campioni e normalizzata sull'attività luciferasica della Renilla. I dati sono stati espressi su una media di almeno tre esperimenti indipendenti.

## 2.11 Analisi di RT-PCR

Gli RNA totali sono stati estratti sia dai linfociti T non frazionati del timo dei topi transgenici N3-IC (tg) e wilde-type (wt) sia dalle linee cellulari pre-T 2017 e N3-232T utilizzando un kit di estrazione (Quiagen) seguendo il protocollo. Una quantità pari a 1 µg di RNA precedentemente estratto è stato sottoposto ad RT-PCR come descritto in letteratura (Felli et al., 1999). La PCR è stata eseguita mantenendo un'appropriata temperatura di annealing e utilizzando i seguenti primers: mouse Jagged1 5'-CTCCTGTCTCGGGATTTGGTTA-3' e 5'-GGGGACACAGACGTTAGAA-3'; mouse β-actina 5'

GTGGGCCGCTCTAGGCACCAAT-3' e 5'-  
CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC-3'. Per quantificare i livelli d'espressione del trascritto, il prodotto della PCR è stato analizzato durante l'amplificazione esponenziale tra i 20-35 cicli. Il campione caricato è stato monitorato tramite il trascritto di  $\beta$ -actina che è stata sottoposta allo stesso trattamento.

## 2.12 RNA ChIP

Le cellule della linea N3-232T sono lavate per due volte in un tampone fosfato di PBS. Si aggiunge formaldeide all'1% e si lascia per 10 minuti a temperatura ambiente affinché avvenga il "crosslink", ossia il legame stabile tra proteine e RNA. Per attenuare l'effetto del "crosslink" si aggiunge glicina alla concentrazione finale di 125mM. Si centrifugano le cellule per 7 minuti a 1200 rpm a +4°C. Il pellet che si evidenzia viene lavato per due volte con il tampone fosfato PBS in presenza di inibitori di proteasi. A questo punto si risospende il pellet in 200  $\mu$ l di buffer A (5mM PIPES a pH=8; KCl 85mM; 0.5% Nonidet P-40; inibitori di proteinasi 1X; SUPERase<sup>•</sup>in 50 U/ $\mu$ l) che permette di lisare le cellule. Si lascia il tutto per 10 minuti in ghiaccio. Si procede con una centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti a +4°C che permette la sedimentazione dei nuclei. Il pellet è lavato nuovamente con la soluzione A priva di Nonidet P-40 e successivamente risospeso in 500  $\mu$ l di soluzione B (1% SDS; 10mM EDTA; 50mM Tris-HCl pH=8.1; inibitori di proteasi 1X; SUPERase<sup>•</sup>in 50 U/ $\mu$ l) lasciando per 10 minuti in ghiaccio. Si effettua così la lisi dei nuclei. Il prodotto di tale reazione è sonicato ad una potenza costante di 7 W per 30 secondi. Si effettua questa procedura per tre volte. Tra ogni evento si sonica si lascia il

campione per almeno 30 secondi in ghiaccio affinché non si degradi l'acido nucleico in quanto tale procedimento determina un riscaldamento significativo del campione. Gli elementi insolubili vengono allontanati dal campione tramite una centrifugazione a massima velocità per 10 minuti a +4°C. Il prodotto della sonicazione è diluito 10 volte in un tampone IP (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris pH= 8.1, 167mM NaCl, inibitori di proteasi 1X, SUPERase•in 50 U/μl) in un volume finale di 1ml. Un'aliquota dell'1% viene mantenuta e conservata a -80°C ed utilizzata come controllo positivo. A questo punto ciascuno campione viene diviso in 3\*n eppendorf, dove n corrisponde al numero di anticorpi che si vogliono testare. Pertanto si procede all'aggiunta, in ciascun tubo, dell'anticorpo specifico, in questo caso Jagged1 (Jagged1-C20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), RBP-Jk (RBP-Jk D-20X Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e di una quantità uguale di IgG. L'incubazione con l'anticorpo avviene per 12-16 ore a +4°C su ruota. Per immunoprecipitare il complesso si aggiungono, a ciascun tubo, 50 μl di proteine A/G Agarose-PLUS (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e si lascia su ruota per 2 ore a +4°C. L'immunocomplesso è centrifugato per 2 minuti a 1000 rpm a +4°C. Ciascun complesso è lavato per cinque volte con 1ml di soluzione per 5 minuti. Le soluzioni utilizzate per effettuare i cinque lavaggi sono rispettivamente:

- LOW-SALT WASH (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 150mM NaCl)
- HIGH-SALT WASH (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 500mM NaCl)

- LiCl WASH (0.25M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deossicolato, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl)
- TE pH=8

Dopo ciascun lavaggio, i complessi sono centrifugati gentilmente per 1 minuti a 1000 rpm e il supernatante aspirato.

Ciascun complesso immune è eluito tramite l'aggiunta di 250µl di Elution Buffer (1%SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 50U/ml SUPERase•in). Il campione è brevemente agitato ed incubato per 15 minuti su ruota a +4°C; il supernatante è raccolto e si ripete la procedura fino ad arrivare ad un volume finale di 500µl.

Per effettuare il "de-crosslink" si aggiunge NaCl alla concentrazione finale di 200mM (anche nell'input) e si lascia per almeno 2ore a +65°C. Successivamente si aggiungono 20µl di Tris-Cl pH=8 1M, 10ul di EDTA 0.5M e 20ug di Proteinasi K. Si incuba per 45 minuti a +42°C. il campione è estratto tramite passaggi i in fenolo e cloroformio, successivamente precipitato con isopropanolo e lavato con etanolo al 75%. Il campione è risospeso in 20 µl di acqua priva di DNAasi.

Il prodotto di tale procedura è sottoposto ad analisi di PCR.

### 2.13 Ratfs

Le cellule N3-232T sopra descritte sono state lavate 2 volte con PBS freddo senza Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>, quindi risospese in 1ml di buffer di lisi (buffer A: Tris HCl 25mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM; supplementato con aprotinina 10mg/ml; leupeptina 10mg/ml, PMSF 1mM e Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM), sonicate e successivamente centrifugate ad 800g per 10 minuti, a +4°C. Il supernatante post-nucleare (PNS) viene quindi incubato con il detergente

Brij all' 1% finale per 1h, a +4°C, vortexando frequentemente. Al termine dell' incubazione i lisati vengono trasferiti in tubi "ultraclear" (Beckman #344057) e mixati con ugual volume di sucrosio 80%. Delicatamente si stratifica su di essi un gradiente di sucrosio, composto da 2ml di sucrosio al 30% ed 1ml di sucrosio al 5%. Dopo ultra-centrifugazione a 48000 rpm, per 16-20hs, a +4°C in rotore SW41 (Beckman Instrument Inc.), vengono recuperate, a partire dall' alto, 12 frazioni da 400ml ciascuna, quindi quantizzate mediante saggio Bradford (Biorad) e successivamente concentrate utilizzando acido-tricloroacetico (TCA). Le frazioni 3-4-5 (rafts) e le frazioni 9-10-11-12 (non rafts) vengono unite tra loro ed un uguale quantità di proteina viene caricata su gel 4-12%, trasferita su membrana di nitrocellulosa e successivamente incubata con gli anticorpi anti-PKC $\theta$  (BD Transduction Laboratories), ed anti-Lck (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), quest' ultimo utilizzato come controllo interno del frazionamento eseguito.

## **2.14 Immunofluorescenza**

Cellule N3-232T sono state fissate in paraformaldeide al 4%, lavata due volte con albumina bovina sierica (BSA) all' 1%, sciolta in PBS, al fine di bloccare la colorazione aspecifica. Le cellule sono state quindi colorate per 1h ad r.t. con l' anticorpo policlonale anti Jagged1 (Jagged1-C20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) seguito da un' incubazione di 30 minuti ad r.t. con l' anticorpo secondario Texas-Red (Jackson Immunoresearch Lab); successivamente con l' anticorpo policlonale anti-Notch3 (Notch3-C20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), seguito dall' anticorpo secondario coniugato FITC (Jackson Immunoresearch Lab).

Tutti i vetrini sono stati esaminati al microscopio a fluorescenza.

### 3. Risultati

#### 3.1 Processamento costitutivo del ligando Jagged1 nella leucemia/linfoma a cellule T indotta da Notch3-IC

Dati di letteratura sostengono l'ipotesi che il gene esprimente il ligando *Jagged1* sia uno specifico bersaglio dei fattori di trascrizione Rel e NF- $\kappa$ B e che tale evento determini l'attivazione della via di segnalazione del recettore Notch nelle cellule adiacenti (Bush J., et al, 1999). In aggiunta, evidenze emergenti dimostrano che, in patologie tumorali dell'ovaio (Chol *et al.*, 2008; Steg *et al.*, 2011) e del colon (Gao J. et al., 2010), i recettori Notch e i loro ligandi DSL possono essere espressi all'interno delle stesse cellule, dettando il decorso clinico della patologia stessa. Inoltre, è dimostrato che l'interazione tra i membri della famiglia Notch e le proteine transmembrana DSL sia responsabile degli eventi di processamento extra- ed intracitoplasmatici di alcuni ligandi, in particolar modo Jagged1. Componenti fondamentali in questo modello sono le metalloproteinasi ADAM17/TACE e le PS/ $\gamma$ -secretasi responsabili rispettivamente del processamento ("shedding") del frammento solubile extracellulare e del rilascio del frammento intracellulare (Jag1-IC), in grado di trasferirsi nel nucleo ed attivare geni bersaglio (Selkoe *et al.*, 2003).

Pertanto, il punto di partenza del nostro studio è stato quello di valutare l'espressione e l'attivazione del ligando Jagged1 in un contesto cellulare deregolato rappresentato da una linea di timociti immaturi derivanti dal topo transgenico per il dominio intracellulare Notch3-IC, N3-232T. Tale linea cellulare immortalizzata ricapitola le caratteristiche leucemiche del topo transgenico per il dominio intracellulare Notch3-IC, ovvero presenta una persistente espressione del gene pTalpha e

un'attivazione costitutiva del complesso trascrizionale NF- $\kappa$ B (Bellavia et al., 2000).

A tal scopo, abbiamo valutato l'espressione del ligando Jagged1 sia in mRNA, tramite RT-PCR, sia in proteina, tramite Western-blotting, nella linea cellulare N3-232T. In figura 1 pannello A e B è possibile osservare un significativo aumento del trascritto e della proteina "full-length" di Jagged1 nelle cellule N3-232T se confrontate con le cellule pre-T 2017, timociti immaturi immortalizzati nello stato differenziativo DNIII, che non presentano alcuna attivazione della via di segnalazione del recettore Notch3 (*Spolsky et al., 1988*). Inoltre, è possibile notare che le cellule N3-232T oltre a mostrare un' aumentata espressione della proteina full-length di Jagged1 presentano anche un suo costitutivo processamento, come mostrato in Figura 1 pannello B in cui si individua un frammento solubile intracitoplasmatico Jagged1-IC di circa 19 kDa, rilasciato a valle del taglio delle PS/ $\gamma$ -secretasi.

È noto che l'azione delle disintegrine-metalloproteinasì ADAM17 innescano, a valle dell'interazione ligando-recettore, il processamento del ligando stesso che è possibile osservare non solo nella formazione dei frammenti intracellulari di cui sopra, ma in particolare nel rilascio del frammento extra-cellulare Jag1 ECD nel mezzo di coltura. A tal proposito, le proteine solubili derivanti dal terreno di coltura della cellule N3-232T sono state analizzate tramite Western blot ed è possibile osservare, come mostrato in Figura 1 pannello C, la presenza del frammento Jag ECD; il plasmide pBABE Jag1 EXT , codificante per la porzione suddetta, è utilizzato come controllo.

Inoltre, poiché i dati di letteratura sostengono il ruolo fondamentale svolto dal complesso enzimatico PS/ $\gamma$ -secretasi nel mediare il taglio proteolitico che determina la liberazione del frammento



intracitoplasmatico del ligando (Jag1-IC), che è stato descritto essere capace di traslocare nel nucleo ed avere un ruolo come proteina segnalante (Selkoe et al., 2000). A tal proposito sono stati effettuati saggi di Western-blott di prodotti proteici del frazionamento cellulare allo scopo di verificare il trasferimento di Jag1-IC nel nucleo delle cellule N3-232T. Come si osserva in Figura 1 pannello D, il frammento intracitoplasmatico Jag1-IC è effettivamente in grado di traslocare nel nucleo.

Poiché la via canonica di segnalazione dei recettori Notch prevede l'espressione del recettore sulla cellula ricevente e l'espressione del ligando sulla cellula segnalante, abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza in cellule N3-232T in grado di sostenere la nostra ipotesi riguardante la co-localizzazione di tali proteine all'interno della stessa cellula N3-232T. Come mostrato in Figura 1 pannello E, Jagged1 (in verde) e Notch3 (in rosso) condividono lo stesso spazio cellulare all'interno della stessa cellula. Questi esperimenti preliminari dimostrano, che in un contesto cellulare caratterizzato da un'attivazione deregolata del dominio intracellulare del recettore Notch3, si ha una co-espressione del recettore Notch3 e del suo ligando Jagged1, evento definito come *cis-espressione*. Inoltre, in tale contesto cellulare, la proteina Jagged1 "full-length" è bersaglio di un costitutivo processamento intracitoplasmatico.

È stato dimostrato che la maggior parte delle proteine, prevalentemente quelle coinvolte nella segnalazione cellulare, sono posizionate all'interno dei microdomini lipidici di membrana (*raft*), fondamentali nella regolazione della traduzione del segnale. Infatti, è noto che tale piattaforma molecolare è essenziale nel processo di attivazione delle cellule T (Gaus et al., 2006). Recentemente, nel nostro laboratorio, è

stato dimostrato che Notch3 è costitutivamente reclutato nei *raft* lipidici presenti sulla membrana plasmatica dei timociti immaturi N3-232T, suggerendo un possibile ruolo del recettore Notch3 nel sostenere/indirizzare l'attivazione dei timociti stessi (Checquolo *et al.*, 2010). Inoltre, diversi studi suggeriscono che il frammento del ligando Jagged1 ancorato alla membrana, dopo essere stato processato dal complesso enzimatico delle Preseniline/ $\gamma$ -secretasi, rilascia un frammento solubile intracellulare che può iniziare un intrinseco meccanismo di segnalazione PDZ-dipendente (Capobianco *et al.*, 2003). Sulla base di queste osservazioni, abbiamo voluto analizzare se il ligando Jagged1 fosse reclutato nei *raft* lipidici di membrana nelle cellule N3-232T e quale fosse il ruolo di tali domini. A tal proposito gli estratti proteici, derivanti dall'isolamento biochimico mediante gradiente di sucrosio, di cellule N3-232T sono stati analizzati mediante Western blotting e come mostrato in Figura 2 pannello A, la proteina Jagged1 full-length e la frazione ancorata alla membrana, Jagged1 TM, sono costitutivamente reclutate nei microdomini lipidici di membrana a differenza del frammento solubile intracellulare Jagged1 IC, che invece è esclusivamente espresso nella porzione dei *non-raft*. Inoltre, poiché è noto che l'intergrità molecolare dei raft di membrana è garantita dalla presenza del colesterolo, composti come la Methyl- $\beta$ -ciclo destrina (M $\beta$ CD), determinando la sua rimozione, inducono la distruzione del raft stesso. Come mostrato in Figura 2 pannello B, estratti proteici derivanti dall'isolamento biochimico mediante gradiente di sucrosio, di cellule N3-232T precedentemente trattate con M $\beta$ CD sono stati analizzati mediante Western-blott ed è possibile osservare che il frammento intracitoplasmatico Jag1IC non può più essere messo in evidenza nella porzione dei *non-raft*.

In letteratura è noto che la metalloproteinasi ADAM17 è il principale mediatore dell'attivazione del ligando in quanto la sua azione dà l'avvio al processamento del ligando stesso ed è propedeutica all'attività del complesso delle PS/  $\gamma$ -secretasi (Selkoe *et al.*, 2003). Inoltre, è noto che le proteine ADAMs vengono sintetizzate come zimogeni inattivi e solo in seguito al loro processamento proteolitico si convertono in una forma catalitica attiva (Endres *et al.*, 2003). A questo proposito abbiamo analizzato l'espressione della metalloproteinasi ADAM17 nei microdomini dei *raft* lipidici di membrana delle cellule N3-232T e come mostrato in Figura 2 pannello C, la forma attiva di tale enzima proteolitico è preferenzialmente espresso nella porzione dei *raft* lipidici delle cellule caratterizzate dalla presenza del transgene Notch3-IC. Queste osservazioni suggeriscono che nelle cellule N3-232T la piattaforma molecolare dei *raft* lipidici di membrana può giocare un ruolo fondamentale nell'attivazione costitutiva del ligando Jagged1, processo mediato dalla metalloproteinasi ADAM17.

Queste osservazioni preliminari suggeriscono che in un modello molecolare di leucemia/linfoma a cellule T indotto da Notch3-IC, rappresentato dalla linea cellulare N3-232T, il recettore Notch3 e il suo specifico ligando Jagged1 sono co-espressi all'interno della stessa cellula, evento noto come *cis-espressione*. Inoltre, i dati fin qui mostrati indicano che il processamento costitutivo del ligando Jagged1 è un evento associato ai microdomini dei *raft* lipidici di membrana ed è mediato dalla metalloproteinasi ADAM17 poiché la distruzione di tale piattaforma lipidica mediante M $\beta$ CD inibisce il rilascio del dominio intracellulare nel citoplasma.

### 3.2. Jagged1 interagisce in *cis* con Notch3 dando vita ad eventi regolatori positivi in cellule N3-232T.

I ligandi DSL sono proteine transmembrana di tipo I espressi sulla superficie di cellule adiacenti alle cellule esprimenti i recettori Notch (D. del Alamo et al., 2011). L'ipotesi maggiormente accreditata in letteratura dimostra che l'attivazione dei recettori Notch avviene a valle della *trans-interazione* ligando-recettore su cellule adiacenti: ipotesi nota come attivazione canonica della via di segnalazione dei recettori Notch. Tuttavia, un numero crescente di studi supportano l'ipotesi dell'esistenza di un'interazione ligando-recettore all'interno di una stessa cellula, sia nei vertebrati sia negli invertebrati (Becam I. et al., 2010; del Alamo D. et al., 2009; Miller A.C. et al., 2009; Fiuza U.M. et al., 2010; Glittenberg M. et al., 2006; Chapman G. et al., 2011). Questi studi supportano l'idea che la *cis*-interazione da un lato riduca la capacità di una cellula di ricevere il segnale dalla cellula adiacente mediante un processo noto come *cis-inibizione* del recettore da parte del ligando, dall'altro lato garantirebbe l'attivazione del recettore nella sola cellula ricevente il segnale. Inoltre, solo recentemente è stato dimostrato il ruolo regolatorio della *cis-interazione*; infatti sia Delta-Like1 che Jagged1 possono interagire con il dominio intracellulare di Notch1 all'interno della stessa cellula e determinare uno spegnimento della via di segnalazione dei recettori all'interno di tale cellula ( Jung. J. et al., 2011; Kim M.Y. et al., 2011).

Pertanto, sulla base di tali informazioni e delle nostre precedenti osservazioni, abbiamo pensato di indagare se Jagged1 e Notch3 co-espressi all'interno delle cellule di leucemia/linfoma a cellule T, N3-232T, potessero interagire tra loro. A tal proposito abbiamo effettuato

saggi di co-immunoprecipitazione su estratti proteici totali e frazionati in cellule N3-232T. In Figura 3 è possibile osservare l'interazione endogena tra il frammento solubile intracellulare C-terminale di Jagged1 e il dominio intracellulare di Notch3 sia in estratti proteici totali (pannello A) sia in estratti proteici frazionati nucleo-citosol (pannello B). In questi esperimenti è possibile osservare che l'interazione ligando-recettore Jag1-IC/Notch3IC avviene a diversi livelli subcellulari: sia a livello dello spazio citoplasmatico (pannello B) sia nel compartimento nucleare, all'interno del quale traslocano entrambe le porzioni solubili intracellulari del ligando Jagged1-IC e del recettore Notch3-IC (pannello B).

Il successivo passaggio sperimentale è stato chiedersi quale fosse il ruolo regolatorio di tale interazione ligando-recettore co-espressi all'interno della stessa cellula. Poiché è stato precedentemente dimostrato, nel nostro laboratorio, che nel processo di leucemogenesi Notch3-IC indotto si ha un'attivazione costitutiva del promotore  $pT\alpha$  (Bellavia D. et al., 2007), ci siamo proposti di indagare se il frammento solubile intracellulare di Jagged1 potesse influenzare o regolare la via di segnalazione di Notch3. A questo scopo sono stati effettuati saggi di luciferasi in timociti immaturi allo stadio differenziativo DNIII, preT 2017, utilizzando il promotore di  $pT\alpha$  come gene reporter. Come mostrato in figura 4 A pannello superiore, il frammento solubile intracitoplasmatico Jagged1-IC è capace di sostenere/potenziare l'attivazione trascrizionale del promotore di  $pT\alpha$  mediata dal complesso attivatorio Notch3-IC, MAML1 e RBP-jk. Infatti l'aggiunta del frammento Jagged1 IC al complesso attivatorio Notch3-IC, MAML1 e RBP-jk determina un'aumento dell'attivazione trascrizionale del gene bersaglio pari al doppio della stessa ottenuta dal solo complesso Notch3-IC, MAML1 e RBP-jk.

Questi risultati suggeriscono che Jagged1 è in grado di sinergizzare con il complesso trascrizionale di Notch3-IC e di sostenere l'attivazione trascrizionale Notch3 dipendente del gene bersaglio pT $\alpha$ . In accordo con i dati di letteratura (Kim M.Y. et al., 20011), interessante è l'osservazione che a differenza di Notch3, il frammento solubile intracitoplasmatico di Jagged1 è in grado di ridurre in modo significativo l'attivazione trascrizionale del gene bersaglio pT $\alpha$  mediata da Notch1 (Figura 4A pannello inferiore).

Per determinare se il ruolo del frammento solubile di Jagged1 come elemento di potenziamento del complesso trascrizionale di Notch3 fosse specifico, sono stati effettuati saggi luciferasici utilizzando come gene bersaglio il promotore di pT $\alpha$  in presenza assenza di sostanze in grado di inibire il processamento della proteina Jagged1 "full-length". A tal proposito cellule Hek293 sono state trasfettate con plasmidi specifici esprimenti le proteine del complesso trascrizionalmente attivo di Notch3 a cui è stato aggiunto il plasmide esprime la proteina Jagged1 FL (che è in grado di andare incontro ad un clivaggio intracellulare e di rilasciare il frammento Jagged1IC). Dopo 6h, le cellule sono state sottoposte ad un trattamento farmacologico con composti che inibiscono in maniera specifica rispettivamente la metalloproteinasi ADAM17/TACE, TAPI 2, e il complesso delle PS/ $\gamma$  secretasi, GSI di tipo I. Come mostrato in figura 4 pannello B e C si assiste ad una riduzione significativa dell'attivazione trascrizionale del promotore di pT $\alpha$  mediata dal complesso attivatorio di Notch3 (N3IC, MAML1, RBP-Jk ) e Jagged1 FL, in presenza di tali composti che inibiscono il processamento del ligando. La riduzione dell'attivazione trascrizionale di pT $\alpha$  in presenza di TAPI-2 correla con una effettiva riduzione del clivaggio intracellulare di Jagged1 come mostrato in saggi di Western

blott in Fig4 pannello D.

Questi esperimenti ci inducono ad affermare l'esistenza di un'azione sinergica tra il recettore Notch3 e il suo specifico ligando Jagged1 sul promotore di pT $\alpha$ , specifico gene bersaglio della via di segnalazione di Notch3 direttamente coinvolto nel processo di trasformazione neoplastica Notch3-IC indotta.

Successivamente ci siamo proposti di analizzare in che modo potesse esplicarsi quest'azione sinergica tra recettore e ligando co-espressi all'interno della stessa cellula ed in particolare ci siamo chiesti se il frammento solubile Jagged1 IC potesse prendere parte nella formazione del complesso trascrizionale di Notch3. A tale scopo abbiamo effettuato dei saggi di co-immunoprecipitazione su cellule Hek 293 precedentemente trasfettate con diverse combinazioni di plasmidi codificanti per le proteine facenti parte del complesso trascrizionale di cui sopra. Come mostrato in Figura 4 pannello E, la porzione solubile intracellulare di Jagged1 (Jag1-IC-myc) è in grado di interagire direttamente con il dominio intracellulare di Notch3IC in presenza di RBP-Jk garantendo così la formazione di un complesso trascrizionale minimo costituito da Notch3-IC-HA, RBP-Jk e Jagged1 IC-myc. A tale complesso è in grado di prendere parte anche il coattivatore per eccellenza delle proteine Notch, MAML1.

Tali osservazioni sperimentali ci suggeriscono che la cis-interazione tra i domini intracellulari del recettore Notch3 e del suo specifico ligando Jagged1 all'interno della stessa cellula, è in grado di determinare la formazione di un nuovo complesso trascrizionalmente attivo che esplica la sua funzione sostenendo/potenziando l'attivazione di uno dei principali geni bersaglio di Notch3, il gene pT $\alpha$ . Inoltre, si evince che in questo particolare contesto cellulare rappresentato dalla

leucemia/linfoma a cellule T indotta da Notch3, la contemporanea presenza del recettore e del ligando determina un articolato evento di *cis-attivazione*, probabilmente in grado di rinforzare uno dei principali eventi responsabili dell'insorgenza e della progressione della patologia indotta da Notch3.

### **3.3 Jagged1 è un diretto bersaglio della via di segnalazione di Notch3 e sostiene la propria attivazione in modo autocrino.**

Dati di letteratura supportano l'esistenza di una specifica relazione tra il recettore Notch3 e il suo specifico ligando Jagged1. In particolare è stato dimostrato che in contesti tumorali Notch3 dipendenti, quali ad esempio il tumore dell'ovaio, si ha un'espressione ectopica del recettore Notch3 e un aumento di espressione del suo specifico ligando DSL, Jagged1. Inoltre è dimostrata l'esistenza di un loop regolatorio positivo tra Notch3 e Jagged1 in grado di sostenere positivamente l'insorgenza della patologia (Chen X., et al., 2010; Choi J. H. et al., 2008).

Abbiamo finora dimostrato che, in un contesto di leucemia/linfoma a cellule T indotto da Notch3-IC, rappresentato dalla linea cellulare N3-232T, il ligando Jagged1 è espresso sia a livello di mRNA sia a livello proteico a differenza di quanto accade nei timociti immaturi preT2017 nei quali la via di segnalazione del recettore Notch3 non è attivata. Pertanto, queste osservazioni ci inducono ad ipotizzare che *Jagged1* potrebbe essere un diretto gene bersaglio della via di segnalazione di



Notch3. Pertanto, per valutare se Notch3 fosse in grado di determinare l'attivazione della regione regolatoria del gene di Jagged1, abbiamo analizzato il ruolo del complesso trascrizionale di Notch3-IC nell'attivare due distinti frammenti di DNA genomico, posti a monte del sito di inizio della trascrizione del gene di Jagged1. A tal proposito abbiamo inizialmente inserito in due vettori luciferasici pGL3 BASIC VECTOR, le regioni d'interesse, rappresentate rispettivamente da un frammento di 1638 bp (Jagged1<sup>-3794/-2156</sup>) e un frammento di 1114 bp (Jagged1<sup>-1351/-237</sup>) (Fig 5 pannelloA). Le sequenze su descritte sono state analizzate tramite il software Genomatix Genome Analyzer che ci ha permesso di individuare sequenze geniche completamente allineate con la sequenza consenso per i fattori leganti il DNA della famiglia CSL/RBP-Jk, rispettivamente due nella sequenza Jagged1<sup>-3794/-2156</sup> tra -3448/-3442 bp e -3275/-3281 bp ed una nella sequenza Jagged1<sup>-1351/-237</sup> tra -997/-991 bp.

Tali putative regioni promotrici, responsive ai fattori CSL/RBP-Jk sono state utilizzate in saggi luciferasici condotti in cellule non linfoidi della line Hek 293, utilizzando combinazioni di plasmidi codificanti rispettivamente per Notch3-IC HA, MAML1-FLAG, RBP-Jk. La figura 5 B pannello di destra, mostra che il complesso trascrizionale di Notch3IC rappresentato da Notch3IC stesso, MAM e RBP-Jk, è in grado di determinare un'attivazione della regione responsiva Jagged1<sup>-1351/-237</sup> di circa 5 volte, se comparate con il controllo. Contrariamente la regione genica Jagged1<sup>-3794/-2156</sup> non è in grado di andare incontro ad attivazione, figura 5 B pannello di sinistra. Questi dati supportano fortemente l'ipotesi iniziale: Jagged1 è un target trascrizionale della via di segnalazione del recettore Notch3, rappresentata dal complesso trascrizionalmente attivo Notch3-IC, MAM e RBP-Jk. Inoltre gli elementi

responsivi a tale complesso attivatorio sono collocati nella regione compresa tra -1351 bp e -237 bp del gene di Jagged1.

Per supportare l'ipotesi dell'attivazione trascrizionale del promotore Jagged1<sup>-1351/-237</sup> mediata dal complesso attivatorio di Notch3 via RBP-Jk, abbiamo condotto saggi luciferasici in cellule Hek 293 in presenza o del plasmide RBP-Jk wt o della controparte non funzionale RBP-Jk R218H. Come mostrato in figura 5 pannello C

l'aggiunta di RBP-Jk R218H è in grado di spegnere completamente l'attivazione trascrizionale della suddetta regione genica, dimostrando che l'attivazione del putativo promotore di Jagged1 è un evento CSL/RBP-Jk dipendente. Per validare ulteriormente l'ipotesi che il complesso trascrizionale di Notch3 fosse in grado di attivare specificamente la regione genica Jagged1<sup>-1351/-237</sup> abbiamo effettuato saggi di mutagenesi della sequenza consenso CSL/RBP-Jk compresa tra -991/-997 bp (Jagged1<sup>-1351/-237</sup> CSL). Questa putativa regione consenso contenente il dominio di legame CSL/RBP-Jk mutato, è stata inserita nel vettore pGL3 BASIC VECTOR e per valutare il suo possibile ruolo nell'attivazione di tale regione genica Notch3-IC mediata, abbiamo condotto esperimenti di attivazione luciferasica in presenza/assenza del complesso trascrizionale di Notch3 in cellule Hek293. Come mostrato dalla figura 5 pannello D, la mutazione della regione compresa tra -1351/-237 bp è in grado di ridurre significativamente l'attivazione trascrizionale, se comparata con la stessa regione genica non mutata. Questi esperimenti dimostrano che la regione consenso compresa tra -1351/-237 bp è necessaria per mediare l'attivazione trascrizionale del gene Jagged1 mediata dal complesso attivatorio di Notch3, via RBP-Jk.

Inoltre, dati di letteratura sostengono che il ligando Jagged1 sia in

grado di potenziare la sua stessa attivazione trascrizionale, dando così vita ad un meccanismo di regolazione positiva (Selkoe et al., 2003). In aggiunta, i nostri precedenti dati dimostrano la capacità del frammento solubile di Jagged1 (Jagged1 IC) di prendere parte al complesso trascrizionale di Notch3IC e di potenziare l'attivazione trascrizionale dei suoi geni bersaglio. Anche sulla base della precedente osservazione, Jagged1 stesso è gene bersaglio dell'azione del complesso trascrizionale di Notch3, ci siamo proposti di investigare se Jagged1 fosse in grado di cooperare con il complesso trascrizionalmente attivo di Notch3 e di determinare la sua stessa attivazione. A tale scopo, timociti immaturi preT 2017, sono stati trasfettati con un'opportuna quantità della regione genica responsiva Jagged1<sup>-1351/-237</sup> in presenza/assenza del complesso trascrizionale di Notch3IC e del frammento solubile Jagged1-IC. In figura 5 pannello D si mostra nuovamente che l'espressione forzata del complesso trascrizionale di Notch3 è in grado di determinare un significativo aumento dell'attività luciferasica di tale regione genica responsiva inoltre, come da noi ipotizzato, l'aggiunta del fattore solubile Jagged1 IC al complesso trascrizionale di Notch3 è in grado di rinforzare tale attivazione. Tale dato supporta l'ipotesi iniziale: il frammento solubile Jagged1 IC è in grado di prendere parte al complesso trascrizionale di Notch3IC e di determinare l'attivazione del suo stesso promotore, dando così vita ad un *loop* auto-regolatorio.

Per valutare ulteriormente se Notch3IC, via RBP-Jk, fosse effettivamente in grado di essere reclutato sulla regione genica responsiva CSL/RBP-Jk è stata effettuato *in vivo* un saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) utilizzando anticorpi specifici per la proteina RBP-Jk. Pertanto la cromatina sonicata estratta

da timociti immaturi N3-232T precedentemente trattati con formaldeide, è stata sottoposta a saggi di immunoprecipitazione per anticorpi specifici per RBP-Jk. Il prodotto dell'immunoprecipitato, dopo opportuna purificazione, è stato amplificato tramite PCR utilizzando specifici primers per il tratto genico di nostro interesse. Come mostrato in figura 5 pannello E, il campione immunoprecipitato con l'anticorpo anti RBP-Jk effettivamente lega la putativa regione CSL/RBP-Jk presente sulla regione responsiva Jagged1<sup>-997/-991</sup> localizzata nella regione -1351/-237 bp (CSL SITO) se confrontata con le IgG di controllo. Inoltre, poiché abbiamo precedentemente dimostrato che anche il frammento solubile di Jagged1 è in grado di prendere parte al complesso trascrizionalmente attivo di Notch3, via RBP-Jk, e di determinare sia il potenziamento di geni bersaglio Notch3 specifici sia di regolare l'attivazione di se stesso, lo stesso saggio di immunoprecipitazione della cromatina è stato effettuato sempre sulla putativa regione responsiva Jagged1<sup>-1351/-237</sup> utilizzando questa volta l'anticorpo anti Jagged1. Il prodotto dell'immunoprecipitato, dopo opportuna purificazione, è stato amplificato tramite PCR utilizzando specifici primers per il tratto genico di nostro interesse. Come mostrato in figura 5 pannello Jagged1 è in grado di legare il sito CSL/RBP-Jk compreso tra -997/-991 bp.

Tutti questi risultati dimostrano, per la prima volta, che il complesso trascrizionale di Notch3-IC è in grado di determinare la trascrizione del suo stesso ligando Jagged1 all'interno della stessa cellula, "in cis". A tal proposito, infatti, abbiamo dimostrato che la regione compresa tra -1351/-237 bp a monte del sito di inizio della trascrizione del gene Jagged1 rappresenta il promotore del gene stesso. Inoltre, non solo abbiamo identificato la regione del promotore del ligando Jagged1, che può essere regolato dalla via di segnalazione di Notch3IC, ma abbiamo

messo in evidenza che il dominio intracellulare di Jagged1 può sostenere la sua stessa trascrizione innescando un loop autocrino, via RBP-JK. L'insieme di questi risultati suggerisce che la coespressione del ligando Jagged1 in cellule aventi un'attivata via di segnalazione del recettore Notch3, potenzia trascrizionalmente l'espressione di due specifici geni bersaglio: pT $\alpha$  e lo stesso Jagged1.

### **3.4 sJag1 ECD attiva la via di segnalazione di Notch3 nelle cellule adiacenti**

Dati di letteratura dimostrano che le ripetizioni EGF-like presenti nel dominio extracellulare del ligando Jagged1 sono coinvolte nel legame con il recettore (Rebay et al. 1993). Inoltre, analogamente ai recettori Notch, il ligando Jagged1 va incontro ad un processamento proteolitico mediato dall'azione combinata della metalloproteinasi ADAM17 e del complesso delle PS/ $\gamma$ -secretasi. Ciò determina il rilascio dei frammenti solubili, Jagged1 ECD e Jagged1 IC. Circa il ruolo funzionale dei frammenti solubili dei ligandi DSL, i dati di letteratura sono molto controversi. È stato dimostrato che il rilascio di tali frammenti solubili a valle dell'azione delle metalloproteinasi ADAMs può avere sia effetti positivi sui recettori Notch( Li H., et al. 2006; Sirpa Aho, 2004; Savary E., et al., 2008 ) sia negativi, spegnendo la loro via di segnalazione(Zolkiewska A., et al 2007). Tuttavia è stato anche dimostrato che le diverse funzioni svolte da tali frammenti solubili siano contesto-dipendenti (Zolkiewska A., et al 2007). A tal proposito abbiamo cercato di investigare il possibile ruolo biologico del frammento solubile extracellulare (sJagged1 ECD) e in particolare abbiamo investigato la

sua capacità di regolare la via di segnalazione di Notch3 nelle cellule adiacenti. Abbiamo precedentemente dimostrato che le cellule N3-232T mostrano un processamento costitutivo del frammento solubile extracellulare (sJagged1 ECD) nel terreno di coltura. Per determinare se sJagged1 ECD avesse la capacità di indirizzare la via di segnalazione di Notch3 nelle cellule adiacenti, abbiamo raccolto il terreno di coltura delle cellule N3-232T condizionato con sJagged1 ECD, abbiamo risospeso timociti immaturi SCB29 in tale terreno e abbiamo analizzato lo stato di attivazione della proteina Notch3 nei timociti seguendo una cinetica temporale (0h, 24h, 48h, 78h). Interessante è l'osservazione che le cellule SCB29 sono in grado di rispondere allo stimolo indotto da sJagged1 ECD presente nel terreno condizionato dei timociti immaturi N3-232T, poiché è possibile osservare un significativo aumento del dominio intracellulare di Notch3 (N3-IC) se confrontate con le cellule non trattate (Figura 6A). Per validare ulteriormente tali dati abbiamo utilizzato farmaci inibitori specifici per il complesso PS/ $\gamma$  secretasi (GSI), in grado di bloccare il processamento intracellulare S3 di Notch3. Come mostrato in figura 6 pannello B, la presenza della GSI è associata con una significativa abrogazione del processamento intracellulare del recettore Notch3. L'insieme di questi dati sperimentali validano l'ipotesi che il frammento solubile sJagged1 ECD, costitutivamente rilasciato dalle cellule N3-232T è in grado di guidare l'attivazione del recettore Notch3 in cellule adiacenti. Inoltre, per comprendere meglio il ruolo biologico di tale frammento solubile, abbiamo condotto saggi di qRT-PCR e abbiamo analizzato l'espressione dei geni bersaglio della via di segnalazione di Notch3 attivata in cellule SCB29 mantenute in cocultura con il terreno condizionato dei timociti immaturi N3-232T, in presenza/assenza di

GSI. Analisi di qRT-PCR dimostrano che l'attivazione del recettore Notch3, guidata dal frammento solubile sJagged1 ECD, induce un significativo aumento dell'espressione dell'mRNA sia di pT $\alpha$  (Figura 6 B pannello sinistra) sia di Jagged1 (Figura 6 B pannello destra), se confrontate con cellule SCB29 non trattate o trattate con GSI.

L'insieme di questi dati dimostra che il frammento solubile sJagged1 ECD, rilasciato nel regione extracellulare, può avere un ruolo positivo, sulla della via di segnalazione del recettore Notch3 espresso sulle cellule adiacenti, attivando il processamento del recettore Notch3 e determinando l'attivazione paracrina di geni bersaglio come pT $\alpha$  e Jagged1 stesso.

### **3.5. Timociti e cellule linfomatose derivanti dal topo transgenico Notch3-IC mostrano un processamento costitutivo del ligando Jagged1.**

Per studiare la putativa relazione esistente tra Notch3 e Jagged1 *in vivo*, abbiamo analizzato l'espressione del ligando Jagged1 nei timociti e nelle cellule T periferiche derivanti dai topi transgenici Notch3-IC (N3-IC tg) e da topi di controllo (WT). Pertanto, timociti e splenociti di topi adulti (5 settimane) N3-IC tg che mostrano evidenze della leucemia/linfoma a cellule T (Bellavia et al., 2000), mostrano una significativa espressione del ligando Jagged1 sia a livello dell'RNA (Figura 7A) sia della proteina (Figura 7B, E) se confrontati con animali di controllo. È interessante notare che gli estratti totali di timociti e splenociti derivanti da topi transgenici Notch3-IC mostrano non solo

l'aumentata espressione della proteina Jagged1 ma anche un suo processamento costitutivo rappresentato dalla presenza di un frammento intracellulare (Jag1ICD) (Figura 7B pannello centrale), sia dal rilascio di un frammento extracellulare solubile identificato nel siero dei topi transgenici N3-IC(Figura 7C). Da notare che sia la forma full length sia i frammenti solubili sono assenti nei timociti e nelle cellule T periferiche derivanti da topi di controllo wild-type (WT) (Figura.7 pannello B, C).

In associazione con l'ipotesi che Jagged1 è substrato dell'attività catalitica della metalloproteasi ADAM17 che media il processamento della regione adiacente alla membrana plasmatica liberando la porzione extracitoplasmatica di Jagged1 (Jag1ECD) e che questo evento è propedeutico all'azione del complesso delle PS/ $\gamma$ -secretasi che rilasciano il frammento intracitoplasmatico Jag1ICD in grado di traslocare nel nucleo e di agire come molecola segnalante, abbiamo analizzato l'espressione dell'enzima ADAM17 tramite saggio di western blotting. In Figura 7D è possibile osservare che topi transgenici Noct3-IC mostrano un'aumentata espressione della forma cataliticamente attiva di ADAM17 se comparati con i topi di controllo wild-type esprimenti, invece, solo la forma immatura dello zimogeno. (PRO ADAM17). Questa osservazione potrebbe sostenere l'ipotesi che l'aumento del frammento Jag1 ECD, presente nel siero dei topi transgenici potrebbe essere dovuto alla presenza della forma attiva di ADAM17.

L'insieme di questi dati dimostrano che la costitutiva espressione del dominio intracellulare di Notch3, che è stato precedentemente dimostrato essere responsabile dell'insorgenza della leucemia/linfoma a cellule T in topi transgenici per il dominio intracellulare Notch3IC



(Bellavia et al., 2000) è anche in grado di controllare l'espressione del suo ligando Jagged1 all'interno delle stesse cellule e che lo stesso Jagged1 sia in grado di andare in contro ad un processamento costitutivo mediato da ADAM17 sia nei timociti sia nelle cellule T periferiche.

I risultati di questi esperimenti *ex vivo* confermano l'esistenza di un loop paracrino/autocrino tra il recettore Notch3 e il suo ligando Jagged1 poichè da un lato il rilascio del frammento Jagged1 ECD nell'ambiente extracellulare dimostra di avere la capacità di attivare il recettore Notch3 espresso su cellule adiacenti amplificando l'attivazione della via di segnalazione del recettore in modo paracrino; dall'altro lato la sintesi del frammento intracitoplasmatico solubile Jag1-ICD presenta la capacità di attivare una propria via di segnalazione intrinseca in grado di potenziare/sostenere la via di trasduzione del recettore Notch3 in modo specifico, supportando il processo di progressione della leucemia linfoblastica acuta a cellule T indotta da Notch3.

#### 4. Discussione

I dati presentati in questa tesi suggeriscono che nei timociti derivanti dal topo transgenico per il dominio intracitoplasmatico N3-ICD, esiste una specifica ed unica relazione tra la costitutiva attivazione del recettore Notch3 e il suo ligando Jagged1. Tale osservazione potrebbe essere un ulteriore tassello da aggiungere al complesso puzzle raffigurante il meccanismo molecolare che sostiene lo sviluppo della leucemia/linfoma a cellule T, tipica dei topi transgenici N3-IC.

Come i recettori Notch, anche i ligandi DSL (Jagged e Delta) vanno incontro ad un processamento proteolitico sequenziale mediato inizialmente dalle metalloproteasi della famiglia ADAM17/TACE, che determinano il rilascio del frammento extracellulare solubile (Jag1-ECD) e la generazione di un frammento adeso alla membrana plasmatica (Jag<sup>TM</sup>) che è substrato dell'azione delle PS/ $\gamma$ -secretasi responsabili del rilascio di un frammento solubile intracitoplasmatico (Jag ICD) (*La Voie et al.*, 2003). La funzione biologica delle forme solubili dei ligandi DSL è controversa; è stato descritto, infatti, che possano avere sia un ruolo agonista sia antagonista nel controllare l'attivazione del signaling dei recettori appartenenti alla famiglia Notch (*Li et al.*, 2004; *Sakamoto et al.*, 2002). Inoltre, dati recenti di letteratura mostrano che cellule aventi livelli elevati di Jagged1, rilasciano nel mezzo di coltura il dominio extracellulare, e questa forma solubile di Jagged1 può interagire con le cellule esprimenti i recettori Notch, in particolar modo Notch3 (*Shimizu et al.*, 1999).

In questo lavoro è dimostrato *in vitro* ed *ex vivo* che cellule aventi un'attivazione costitutiva della via di segnalazione di Notch3 mostrano un'aumentata espressione del ligando Jagged1 full-length all'interno

della stessa cellula, fenomeno noto come *cis espressione*. Inoltre, molto intrigante è l'osservazione che in tale contesto cellulare, a valle della forzata attivazione di Notch3-IC, il ligando Jagged1 va incontro ad un processamento costitutivo, che si evince con il rilascio del frammento extracellulare solubile JECD, nel mezzo di coltura cellulare e/o nel siero dei topi, e il frammento intracitoplasmatico JagICD nel citosol, in grado di trascolare nel nucleo.

In un precedente lavoro, è stato dimostrato che i timociti immaturi derivanti dal topo transgenico Notch3-IC presentano microdomini lipidici di membrana (*raft*) nei quali il recettore Notch3 viene costitutivamente reclutato, evento associato ad uno stato di attivazione costitutiva della cellula (Checquolo et al., 2010). Numerosi altri dati di letteratura supportano l'ipotesi del ruolo funzionale di tali "zattere" lipiche presenti sulla membrana plasmatica dei timociti attivati, poiché favorirebbero l'organizzazione in *cluster* di molecole segnalanti. In questa tesi abbiamo dimostrato che anche il ligando DSL Jagged1, in quanto molecola segnalante, è reclutato in modo costitutivo nei *raft* lipici delle cellule N3-232T, e tale evento è di fondamentale importanza per mediare la sua attivazione proteolitica, ADAM17-dipendente.

Discordanti invece sono i dati di letteratura atti a definire il ruolo funzionale e biologico dei frammenti solubili. Infatti se da una parte si dimostra che il dominio intracellulare di Jagged1 ICD è in grado non solo di regolare l'espressione dell'mRNA di Jagged1 e di Notch3, ma anche di indurre la trasformazione neoplastica mediante il suo dominio PDZ-ligando posizionato nella regione carbossi-terminale (Ascano et al., 2003), dall'altra si dimostra che lo stesso frammento intracitoplasmatico Jagged1 ICD è in grado di interferire con la formazione del complesso trascrizionale di Notch1 determinando la sua

degradazione proteolitica via proteasoma. Il nostro lavoro ci ha permesso di evidenziare che nello specifico contesto della leucemia/linfoma a cellule T Notch3 indotta, il frammento solubile Jag1ICD è in grado di prendere parte al complesso trascrizionale di Notch3 rappresentato da N3ICD, MAML1 e RBP-Jk e di determinare un potenziamento dell'attivazione dei geni target di Notch3 quali pT $\alpha$  amplificando i meccanismi molecolari responsabili dell'insorgenza della patologia neoplastica in modo autocrino.

Inoltre, qui, abbiamo individuato Jagged1 come nuovo gene bersaglio dell'azione del complesso trascrizionale attivatorio di Notch3ICD. Questo evento è di fondamentale importanza nel mantenimento della condizione trasformante poiché si ha da un lato l'espressione *in cis* delle due molecole segnalanti Jagged1 e Notch3 che in seguito alla loro attivazione proteolitica attiveranno in modo autocrino la via di segnalazione del recettore Notch3, dall'altro lato l'aumento d'espressione di Jagged1 in cellule esprimenti Notch3 potrebbe favorire anche l'attivazione del recettore *in trans* in molecole adiacenti amplificando il meccanismo tumorale deregolato.

Attenzione deve essere posta anche nell'altro frammento solubile derivante dal processamento della porzione extracellulare del ligando Jagged1 liberato nel mezzo di coltura e/o nel siero dei topi transgenici per Notch3-ICD, JagECD. Noi dimostriamo che tale frammento è in grado di attivare in maniera specifica la via di segnalazione di Notch3 nelle cellule adiacenti in modo paracrino.

In conclusione, nel presente lavoro è stato dimostrato che l'espressione costitutiva di Notch3-IC è in grado di determinare sia l'overespressione di Jagged1 full-length, sia il processamento costitutivo di Jagged1 stesso all'interno delle stesse cellule esprimenti Notch3.

Inoltre, l'insieme dei dati presentati in questa tesi, ci permettono di suggerire un modello in cui Notch3 è in grado di attivare il signaling di Jagged1. Infatti, il suo dominio intracellulare può traslocare nel nucleo e potenziare il signaling di Notch3 in modo autocrino. Al fine di sostenere questa ipotesi, abbiamo dimostrato che Jagged1ICD gioca un ruolo importante nella regolazione sia dei geni bersaglio specifici del signaling di Notch3 (pT $\alpha$ ) sia del promotore Jagged1 stesso e in questo modo partecipare all'insorgenza della leucemia/linfoma a cellule T indotta da Notch3. Inoltre abbiamo dimostrato che l'attivazione costitutiva di Notch3 determina, *in vivo* e *in vitro*, un'aumentata espressione della liberazione del dominio extracellulare di Jagged1 (shedding), rivelabile nel siero dei topi o nel mezzo delle colture cellulari, capace di attivare il signaling di Notch3 in modo paracrino, attivando i recettori Notch espressi sulle cellule adiacenti.

Nel complesso questi dati supportano l'ipotesi sempre più accreditata, anche se controversa, del ruolo funzionale svolto dai ligandi DSL sia nell'insorgenza di numerose patologie tumorali quali il tumore dell'ovaio(Choi J.H. et al., 2008), del polmone (Lin L., 2010), dell'intestino(Gao J. et al., 2010) e del seno(Reedjik M., et al.2005), sia nel mantenimento che nell'insorgenza verso un destino infausto di tali patologie.

## Bibliografia

**Aho S.** *Soluble form of Jagged1: unique product of epithelial keratinocytes and a regulator of keratinocyte differentiation.* J. Cell Biochem. 2004; 92(6): 1271-81

**Aifantis, I., Buer, J., von Boehmer, H. and Azogui, O.** *Essential Role of the Pre-T-Cell Receptor in Allelic Exclusion of the T Cell Receptor  $\beta$  Locus.* Immunity 1997; 7, 601-607

**Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.** *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.* Science 1999, 284, 770-776

**Ascano J.M., Beverly L.J., Capobianco A.J.,** *The C-terminal PDZ-ligand of Jagged1 is essential for cellular transformation* J. Of Biological Chemistry 2003; 278: 8771-8779

**Aster, J.C., Xu, L., Karnell, F.G., Patriub, V., Pui, J.C. and Pear, W.S.** *Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domain in induction of T-cell leukemia by Notch1.* Mol Cell Biol 2000; 20, 7505-7515.

**Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G.,** *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities* J. Cell Sci 2002; 115: 3719-3727

**Becam I., Fiuza U.M., Arias A.M., Milan M.,** *A role of receptor notch in ligand cis-inhibition in Drosophila,* Curr. Biol. 20 (2010) 554–560

**Bellavia, D., Campese, A.F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M.P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M., Gaetano, C., Ruco, L., Hoffman, E.S., Hayday, A.C., Lendhal, U., Frati, L., Gulino, A. and Screpanti, I.** *Constitutive activation of NF- $\kappa$ B and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice.* EMBO J. 2000; 19, 3337-3348

**Bellavia D., Campese A.F., Checquolo S., Balestri A., Biondi A., Cazzaniga G., Lendahl U., Fehling H.J., Hayday A.C., Frati L., von Boehmer H., Gulino A. and Screpanti I.** *Combined expression of pTa and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis.* Proc Natl Acad Sci USA 2002; **6**, 3788-93.

**Bellavia D. Mecarozzi M., Campese A.F., Grazioli P., Talora C., Frati L., Gulino A., Screpanti I.** *Notch3 and The notch3- up regulated RNA binding protein Hud regulate Ikaros alternative splicing.* Embo J. 2007; **26**: 1670-1680.

**Bellavia D., Mecarozzi M., Campese A.F., Grazioli P., Gulino A., Screpanti I.** *Notch and Ikaros: not only converging players in T-cell leukemia.* Cell cycle 2007; **6**: 2730-2734

**Black R. A., Rauch C.T., Kozlosky C.J. et al.,** *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells.* Nature 1997; **385**: 729-733

**Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S.** *Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane.* Cell 1997; **90**:281-291

**Bruno, L., Rocha, B., Rolink, A., Von Boehmer, H. and Rodewald, H.-R.** *Intra- and extra-thymic expression of the pre-T cell receptor a gene.* Eur. J. Immunol.1995; **25**, 1877-1882

**Burry, R. W., and Smith, C. L.** *HuD distribution changes in response to heat-shock, but not neurotrophic stimulation.* J. Histochem. Cytochem. 2006; **54**, 1129–1138.

**Cerretti D.P., Poindexter K., Castner B.J., Means G., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Black R.A., Nelson N.** *Characterization of th cDNA and gene for mouse tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) and its location to mouse chromosome 12 and human chromosome 2p25.* Cytokine 1999; **11**: 541-551

**Chapman G., Sparrow D.B., Kremmer E., Dunwoodie S.L.,** *Notch inhibition by ligand Delta-Like3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis*, Hum.Mol.Genet. 20 (2011) 905-916

**Choi J.H., Park J.T., Morin P.J., Shih I.M., Wang T.L.**Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion Cancer Res. 2008;68: 5716-5723.

**Davis RL, Turner DL.** *Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning*. Oncogene 2001; 20: 8342-8357

**D. del Alamo, H. Rouault, F. Schweisguth,** *Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling*, Curr. Biol. 21 (2011) R40–R47

**D. del Alamo, F. Schweisguth,** *Notch signalling: receptor cis-inhibition to achieve directionality*, Curr. Biol. 19 (2009) R683–R684

**Del Porto, P., Bruno, L., Mattei, M. G., Von Boehmer, H. and Saint-Ruf, C.** *Cloning and comparative analysis of the human pre-T-cell receptor  $\alpha$  chain gene*. Proc. Natl. Acad. Sci.1995; **19**, 121058-121059

**Defetos, M.L. and Bevan, M.J.** *Notch signaling in T cell development*. Curr Opin Immunol 2000; **12**, 166-172.

**Diaz-rodriguez E., Monter J.C., Esparis-Ogando A., Yuste L., Pandiella A.** *Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding* Mol Biol Cell 2002; 13: 2031-2044

**Edwards D.R., Handsley M.M., Pennintong C.J.,** *The ADAM metalloproteinases* Molecular Aspects of medicine 2008; 29: 258-289

**Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D. and Sklar, J.** *TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. Cell 1991; **66**, 649-661



**Fan, X. C., and Steitz, J. A.** HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95, 15293–15298.

**Fehling H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., Von Boehmer, H.** *Crucial role of the pre-T-cell receptor gene in development of ab but not gd T cells.* *Nature* 1995; **375**, 795-798.

**Felli, M.P., Maroder, M., Mitsiadis, T.A., Campese, A.F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R.S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A. and Screpanti, I.** *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.* 1999, **11**, 1017-1025.

**Ferri L.E., Pascual J., Seely A.J., Chaudhury P., Christou N.V.** *soluble L-selectin attenuates tumor necrosis factor-alpha-mediated leukocyte adherence and vascular permeability: a protective role for elevated soluble L-selectin in sepsis* *Crit. Care Med.* 2002; 30: 1842-1847

**Fleming, R.J., Purcell, K. and Artavanis-Tsakonas, S.** *The NOTCH receptor and its ligand.* *Trends Cell Biol* 1997; **7**, 437-441

**U.M. Fiuza, T. Klein, A. Martinez Arias, P. Hayward,** *Mechanisms of ligand-mediated inhibition in notch signaling activity in Drosophila,* *Dev. Dyn.* 239 (2010) 798–805

**Fiuza U.M., Arias A.M.** *Cell and molecular biology of Notch* *J. Of Endocrinology* 2007; 194: 459-474

**Fowlkes BJ, Robey EA.** *A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development.* *J Immunol.* 2002; 169, **4**, 1817-21

**Gao J., Liu J., Fan D., Xu H., Xiong Y., Wang Y., Xu W., Wang Y., Cheng Y., Zheng G.,** *Up-regulated expression of Notch1 and Jagged1 in human colon carcinoma* *Pathol. Biol.* 2011, 59(6):298-302

**Glittenberg M., Pitsouli C., Garvey C., Delidakis C., Bray S.,** *Role of conserved intracellular motif in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis*, EMBO J., (2006) 4697-4706

**Godfrey D.J., Kennedy J., Suda T., Zlotnik A.,** *A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subset of CD3-CD4-CD8- triple negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression* J.Immunol 1993; 150, 4244-4252.

**Hoffman, E.S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T.M.J., Schatz, D.G., Koff, A., Owen, M.J. and Hayday, A.C.** *Productive T-cell receptor b-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo.* Genes Dev. 1996, **10**, 948-962.

**Jameson, S. and Bevan, M.** *T-cell selection.* Curr. Opin. Immunol. 1998, **10**, 214-219.

**Jeffries S, Robbins D.J. & Capobianco A. J.** *Characterization of a high-molecular-weight complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line.* Mol Cell Biol. 2002; 11: 3927-3941

**Jung. J., Mo J.S., Kim M.Y., Ann E.J., Yoon J.H., Park H. S.,** *Regulation of Notch1 signaling by delta-like ligand 1 intracellular domain trouhu physical interaction.,* Mol Cells (2011)

**Kim M.Y., Jung J., Mo J.S., Ann E.J., Ahn J.S., Yoon J.H., Park H.S.,** *The intracellular domani of Jagged1 interacts with Noych1 intracellular domain and promotes its degradation trough Fbw7 E3 ligase* Exp. Cell Reserch 20011

**Konishi J., Keiko S.K., Huan V., Nobuhiro H., Gonzalez A., carbone D.P., Dang T. P.**  *$\gamma$ -Secretase inhibitor prevents Notch3 Activation and reduces proliferation in human lung cancrs.* Cancer Res. 2007;.67: 8051-8057.

**Koo B.K., Yoon K.J., Yoo K.W., Lim H.S., Song R., So J.H., Kim C.H., Kong Y.Y.** *Mind Bomb-2 is an E3ligase for Notch ligand* J. Of Biological Chemistry 2005; 280: 23, 22335-22342

**Koo B.K., Lim H.S., Song R., Yoon M.J., Yoon K.J., Moon J.S., Kim Y.W., Kwon M.C., Yoo K.W., Kong M.P., Lee J., Chitnis A.B., Kim C.H., Kong Y.Y.** *Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch* Development 2005; 132: 3459-3470.

**Lardelli, M., Williams, R. and Lendahl, U.** *Notch-related genes in animal development.* Int. J. Dev. Biol. 1995, **39**, 769-780

**LaVoie MJ, Selkoe DJ.** *The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments.* J. Of Biological Chemistry 2003; 278: 34427-34437

**Li H, Yu B, Zhang Y, Pan Z, Xu W, Li H.** *Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2006; 341(2): 320-325

**Li Y., Baker NE.** *The role of cis-inactivation by Notch ligands and of neuralized during eye and bristle patterning in Drosophila* BMCV Dev. Biol, 2004; 27: 4-5

**Lin L., Mernaugh R., Yi F., Blum D., Carbone DP., Dang TP.** *Targeting specific regions of Notch3 ligand-binding domain induces apoptosis and inhibits tumor growth in lung cancer.* Cancer Res. 2010 Jan 15; 70(2): 632-8

**Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Grossler, A. and Weinmaster, G.** *Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development.* Mol. Cell. Neurosci. 1996, **8**, 14-27

**MacDonald, H.R. and Wilson, A.** *The role of T-cell receptor (TCR) in ab/gd lineage commitment: clues for intracellular TCR staining.* Immunol Rev 1998, **165**, 87-94

**McDermott M.F., Aksentijevich I., Galon J et al.** *Germiline mutations in the extracellular domains of the 55 KDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndrome* Cell 1999; 97: 133-144

**Mezyk R., Bzowska M., Bereta J.,** *Structure and functions of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* Acta Biochim. Pol 2003; 50: 625-645

**A.C. Miller, E.L. Lyons, T.G. Herman,** *Cis-inhibition of notch by endogenous delta biases the outcome of lateral inhibition,* Curr. Biol. 19 (2009) 1378–1383

**Milner, L.A. and Bigas, A.** *Notch as a mediator of cell fate determination in Hematopoiesis: evidence and speculation.* Blood 1999; **93**, 2431-2448.

**Moloney DJ., Panin V.M., Johnston S.H., Chen J., Shao L., Wilson R., Wang Y., Stanley P., Irvine K.D., Haltiwanger R.S., Wogt R.S.** *Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch* Nature 2000; 406: 369-375

**Moore M.J.** *from birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs* Science 2005; 309: 1514-1518

**Morel V, Lecourtois M, Massiani O, Maier D, Preiss A, Schweisguth F.** *Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in Drosophila.* Current Biology 2001; 11:789-792

**Okajima T., Xu A., Lei L., Irvine KD.** *Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase1 promotes Notch receptor folding* Science 2005; 307: 1599-1605

**Ohtsu H., Dempsey P.J., Eguchi S.,** *ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors* Am J Physiol Cell Physiol 2005; 291:C1-10

**Oswald F, Winkler M, Cao Y, Astrahantseff K, Bourteele S, Knochel W, Borggreffe T.** RBP-J $\kappa$ /SHARP recruits CtlIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 10379-10390

**Panin V.M., Shao L., Lai L., Moloney D.J., Irvine K.D., Haltiwanger R.S.** *Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and fringe* .*J. Of Biological Chemistry* 2002; 277: 29945-29952

**Pear, W.S., Aster, J.C., Scott, M.L., Hasserjian, R.P., Soffer, B., Sklar, J. and Baltimore, D.** *Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles*. *J. Exp. Med.* 1996; **183**, 2283-2291.

**Pear W.S., Radtke F.,** *Notch signaling in lymphopoiesis*. *Semin Immunol* 2003; 2, 69-79.

**Pintar A., De Biasio A., Popovic M., Ivanova N., Pongor S.,** *The intracellular region of notch ligands: does the tail make the difference?* *Biology Direct*; 2007

**Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C. and Pear, W.S.** *Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination*. *Immunity* 1999; **11**, 299-308.

**Qi H, Rand MD, Wu X, Sestan N, Wang W, Rakic P, Xu T, Artavanis-Tsakonas S.** *Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian*. *Science* 1999; 283: 91-94

**Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R. and Aguet, M.** *Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1*. *Immunity* 1999; **10**, 547-558.

**Rebay I, Fehon RG, Artavanis-Tsakonas S.** *Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor*. *Cell* 1993, 74: 319-329.

**Reedjik M., Odorcic S., Chang L., Zhang H., Miller N., McCready DR., Lockwood G., Egan SE.** *High-level coexpression of Jag1 and Notch1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival.* *Cancer Res.* 2005 Sep 15; 85 (18): 8530-7

**Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G. and Salmon, P.** *An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages.* *Cell* 1996; **87**, 483-492

**Saint-Ruf, C., Lechner, O., Feinberg, J. and Von Boehmer, H.** *Genomic structure of the human pre-T cell receptor  $\alpha$  chain and expression of two mRNA isoforms.* *Eur. J. Immunol.* 1998, **28**, 3824-3831.

**Saint-Ruf, C., Panigada, M., Azogui, O., Debey, P., von Boehmer, H. and Grassi, F.** *Different initiation of pre-TCR and gdTCR signalling.* *Nature* 2000; **406**, 524-527.

**Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J. and von Boehmer, H.** *Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene.* *Science* 1994; **266**, 1208-1212.

**Sakamoto K., Ohara O., Takagi M., Takeda S., Katsube K.** *Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification* *Dev Biol*, 2002; 15: 313-326.

**Savary E, Sabourin JC, Santo J, Hugnot JP, Chabbert C, Van De Water T, Uziel A, Zine A.** *Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential.* *Mech. Dev.* 2008; 125(8):674-86

**Seidelin J.B. Nielsen O.H., Strom J.** *Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis* *Intensive Care Med* 2002; 28. 1613-1618

**Song R, Koo B.K., Yoon K.J., Yoon M.J., Yoo K.W., Kim H.T., Oh H.J., Kim Y.Y., Han J.K., Kim C.H.K., Kong Y.Y.** *Neuralized-2 regulates a Notch ligand in cooperation with Mind Bomb-1* J. Of Biological Chemistry 2006; 281: 47, 36391-36400

**Shimizu K., Chiba S., Kumano K., Hosoya N., Takahasashi T., Kanda Y., Hamada Y., Yazaki Y., Hirai H.,** *Mouse Jagged1 physically interacts with Notch2 and other Notch receptors* J. Of Biological Chemistry 1999; 274: 32961-32969

**Shimizu K., Chiba S., Toshiki S., Kumano K., Hirai H.,** *Physical interaction of Delta1, Jagged1, and Jagged2 with Notch1 and Notch3 receptors* Biochem Biophys Res Commun 2000; 276: 385-389

**Spolski R., Miescher G., Ersrd F., Risser R., MacDonald H.R., Mak T.K.** *Regulation of expression of T cell  $\gamma$  chain, L3T4 and Ly-2 messages in Abelson/Moloney virus-transformed T cell lines.* E.J.Immunol 1998; 18: 295 - 300

**Struhl G., Fitzgerald K., Greenwald I.,** *Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo.* Cell 1993; 74: 331-345

**Voll RE, Jimi E., Phillips RI, Barber DF, Rincon M Hayday AC., Flavell RA., Ghosh S.** *NF- $\kappa$ B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocytes development.* Immunity 2000; **13**, 677-689.

**von Boehmer, H., Aifantis, I., Feinberg, J., Lechner, O., Saint-Ruf, C., Walter, U., Buer, J. and Azogui, O.** *Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor.* Curr. Opin. Immunol. 1999; **11**, 135-142

**von Boehmer, H. and Fehling, H. J.** *Structure and function of the pre-T cell receptor.* Annu. Rev. Immunol. 1997, **15**, 433-452.

**Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B.J., Cado, D. and Robey, E.** *Notch activity influences the ab versus gd T cell lineage decision.* Cell 1997; **88**, 833-843.

**Weinmaster G., Nichols J.T., Miyamoto A.,** *Notch signaling-Costantly on th move* Traffic 2007; 8: 959-969

**Weinmaster G, D'Souza B., A. Myamoto** *Tha many facets of Notch ligands* Oncogene 2008; 27: 5148-5167

**Winandy S. Wu L., Wang J.H. Georgopoulos K.** *Pre-T cell receptor (TCR) and TCR-controlled checkpoints in T cell differentiation are set by ikaros.* J. Exp. Med 1999; 190. 1039-1048.

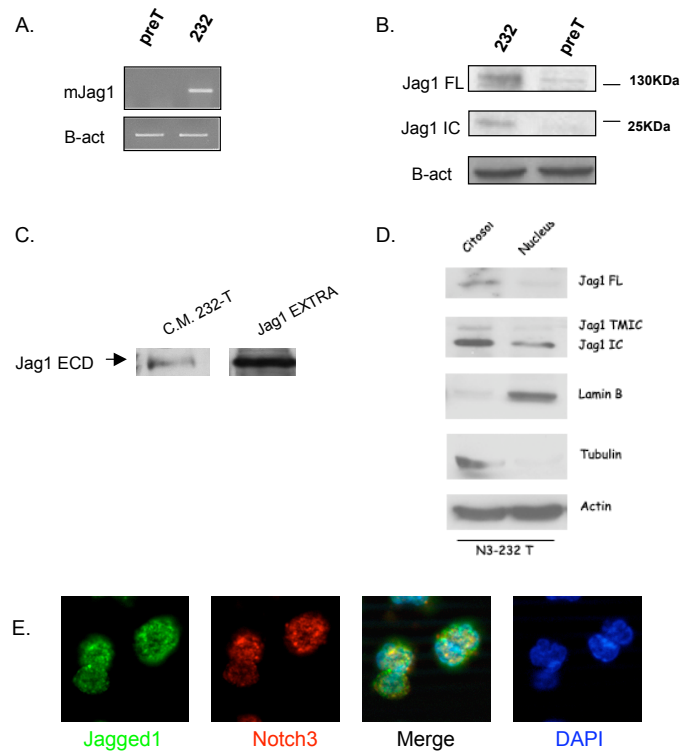
**Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD.** *MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator, for Notch receptors.* Nat. Genet 2000; 26:484-489

**Zhang Y., Jiang J., Black R.A., Baumann G., Frank SJ.** *Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation* Endocrinology 2000; 141: 4342-4348

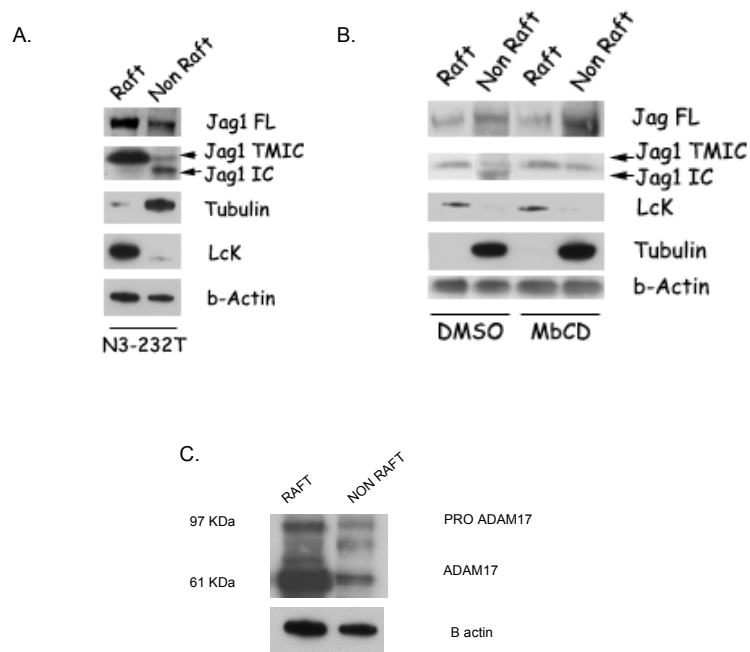
**Zùniga-Pflucker, J.C. and Lenardo, M.J.** *Regulation of thymocyte development from immature progenitors.* Curr Opin Immunol 1996, 8, 215-224



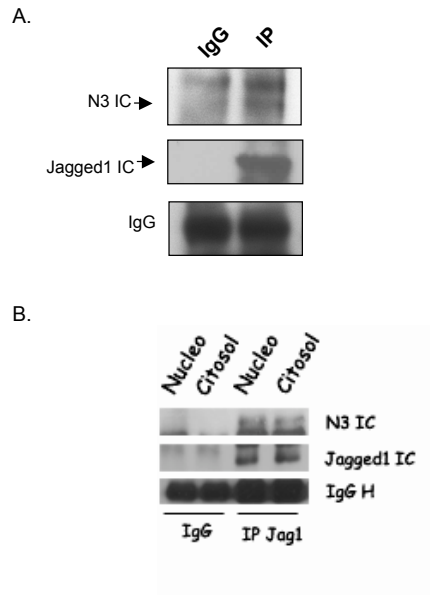
## Figure



**Figura1 Cis-espressione del recettore Notch3 e del suo specifico ligando Jagged1:** (A) l'mRNA di timociti immaturi preT 2017 e N3-232 T è stato utilizzato per valutare l'espressione del ligando Jagged1 tramite RT-PCR. L'espressione della  $\beta$ -actina è considerata un normalizzatore della quantità di campione analizzato. (B) analisi di Western-blott di estratti proteici totali di cellule pre-T 2017 e N3-232 T mostra l'espressione del ligando Jagged1 FL e del suo costitutivo processamento nelle sole cellule N3-232T (C) analisi di Western-blott di proteine solubili concentrate nel mezzo di coltura cellulare delle N3-232T rivela la presenza del frammento extracellulare del ligando Jagged1(Jag ECD); il plasmide pBabe Jag EXT è utilizzato come controllo positivo. (D) analisi di Western-blott di estratti proteici frazionati nucleo/citosol di cellule N3-232T mostra che la proteina FL è localizzata prevalentemente nella porzione citosolica mentre il frammento solubile intracellulare Jagged1IC è in grado di traslocare dal citosol al compartimento nucleare. La laminina B e la tubulina sono utilizzati come marcatori dei compartimenti cellulari; l'actina è utilizzata come controllo della quantità di proteina analizzata. (E) cellule N3-232T sono state sottoposte ad esperimenti di immunofluorescenza utilizzando specifici anticorpi in grado di riconoscere la porzione C-ter delle diverse proteine e coniugati con diversi fluorocromi, rispettivamente Jagged1-Fitch e Notch3-PE. Come mostrano le figure acquisite tramite microscopio a fluorescenza, il recettore Notch3 e il suo ligando Jagged1 sono espressi all'interno della stessa cellula. Il DAPI è usato come controllo.

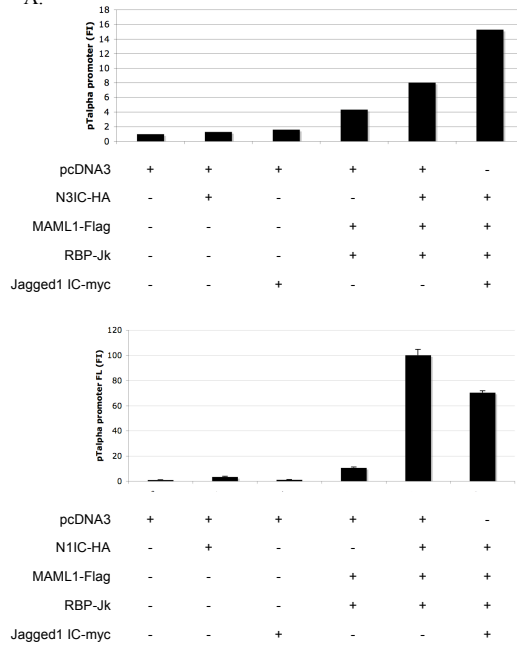


**Figura2 Il costitutivo processamento del ligando Jagged1 è un evento RAFT-dipendente:**  
**(A)** Western-blott di estratti proteici ottenuti da cellule N3-232T sottoposte ad un gradiente di sucrosio ed ultracentrifugazione mostrano che la proteina Jagged1 FL e il frammento Jagged1 TM, derivante dal primo clivaggio mediato da ADAM17/TACE ancorato alla membrana plasmatica, sono prevalentemente reclutati nei RAFT lipidici; il frammento solubile intracellulare Jagged1 IC liberato a valle del taglio mediato dal complesso delle PS $\gamma$ -secretasi è rivelabile nella porzione dei NON RAFT. Lck e tubulina sono utilizzati rispettivamente come normalizzatori dei compartimenti dei RAFT e dei NON RAFT; l'actina è utilizzata come controllo della quantità di proteine analizzate. **(B)** cellule N3-232T trattate rispettivamente con M $\beta$ CD per 20' a 37°C e con DMSO di controllo sono state sottoposte all'estrazione proteica dei compartimenti RAFT e NON RAFT. L'analisi di Western-blott mostra che la deplezione dei microdomini di membrana dei RAFT mediante l'utilizzo di M $\beta$ CD abroga il clivaggio costitutivo del ligando Jagged1, rivelabile dalla mancanza del frammento solubile intracellulare Jagged1IC. Lck e tubulina sono utilizzati rispettivamente come normalizzatori dei compartimenti dei RAFT e dei NON RAFT; l'actina è utilizzata come controllo della quantità di proteine analizzate. **(C)** analisi di espressione della proteina ADAM17/TACE tramite Western-blott in estratti proteici rappresentati i compartimenti cellulari dei RAFT e NON RAFT in cellule N3-232T.

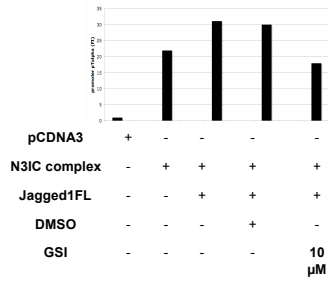


**Figura3 Cis Interazione dei frammenti intracellulari Jagged1IC e Notch3IC** : Saggio di co-immunoprecipitazione condotto in estratti totali (A) e frazionati Nucleo/Citosol (B) di cellule N3-232T sono stati analizzati tramite Western-blot. L'immunoprecipitazione ha previsto l'utilizzo di un anticorpo in grado di riconoscere la porzione C-ter di Jagged1. Mentre il blot è stato effettuato con un anticorpo in grado di riconoscere la porzione C-ter di Notch3. Come è possibile osservare Il frammento Jagged1IC e Notch3IC sono in grado di interagire nello spazio cellulare e tale interazione avviene anche nel compartimento nucleare. Le catene pesanti delle IgG (IgG H) sono utilizzate come controllo della quantità di anticorpo utilizzata.

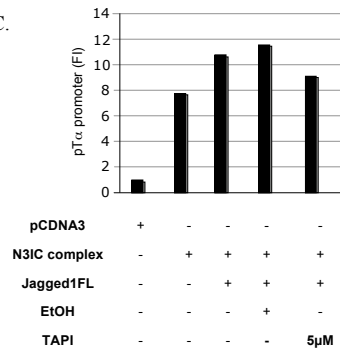
A.

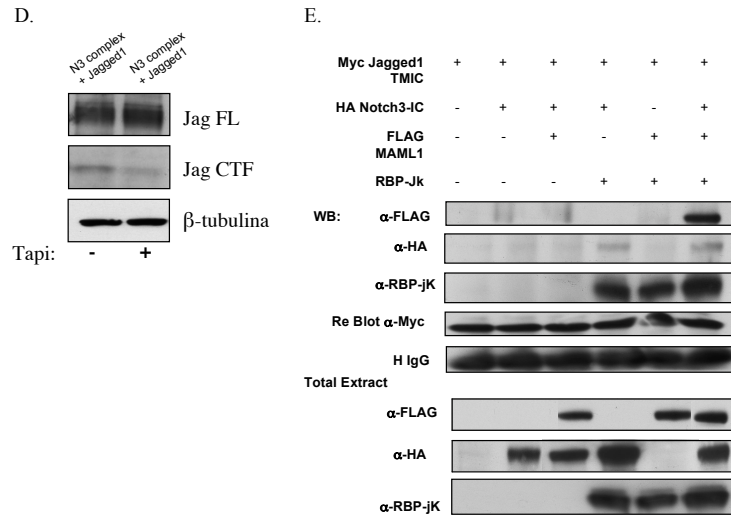


B.



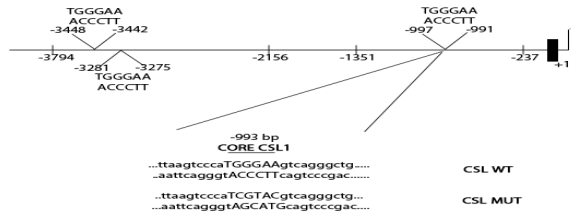
C.



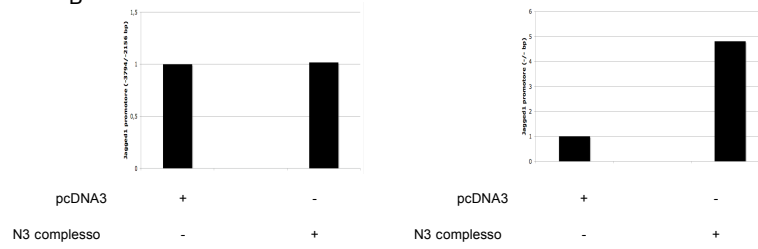


**Figura4 Jagged1IC prende specificamente parte al complesso trascrizionale di Notch3IC potenziando l'attivazione dei suoi geni target :** (A) cellule preT 2017 sono state trasfettate con combinazioni differenti di plasmidi codificanti per MAML1-Flag, RBP-Jk, Jagged1-IC-myc, Notch3IC-HA o Notch1IC-HA e tramite saggio luciferasico si valuta l'attivazione del gene reporter pT $\alpha$ . Come mostrato l'attivazione trascrizionale di pT $\alpha$  mediata dal complesso attivatorio di Notch3 (MAML1-Flag, RBP-Jk, Notch3IC-HA) è maggiore di 7 volte se confrontata con l'attivazione data dal solo Notch3IC-HA tuttavia l'aggiunta di Jagged1IC-myc al complesso attivatorio di Notch3IC è in grado di raddoppiare l'attivazione di pT $\alpha$  se confrontata con quella data dal solo complesso di Notch3IC-HA, RBP-Jk e MAML1-Flag. Il medesimo esperimento è stato effettuato utilizzando invece Notch1IC-HA e come mostrato dal pannello inferiore, l'aggiunta di Jagged1IC-myc al complesso trascrizionale MAML1-Flag, RBP-Jk e Notch1IC-HA determina una riduzione dell'attivazione trascrizionale del gene pT $\alpha$  di circa 40 volte se confrontata con l'attivazione data dal complesso Notch1IC-HA, MAML1-Flag e RBP-Jk. (B) (C) per validare l'osservazione che Jagged1 è in grado di cooperare con il complesso trascrizionalmente attivo di Notch3 sono stati condotti saggi luciferasici in cellule preT 2017 utilizzando Jagged1 FL con/senza il complesso trascrizionale Notch3IC-HA, MAM-Flag e RBP-Jk e 12h dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con farmaci in grado di inibire specificamente ADAM17/TACE (TAPI-2) e il complesso delle PS $\gamma$ -secretasi(GSI). Come mostrato il trattamento con TAPI-2 (B) e con GSI (C) inibendo il clivaggio del plasmide Jagged1 FL ed in conseguente rilascio del frammento solubile Jagged1IC sono in grado di abrogare l'effetto trascrizionale additivo dato da Jagged1IC. (D) estratti proteici totali delle cellule preT 2017 a valle della trasfezione e del trattamento con TAPI-2 di cui al punto (C) sono stati analizzati tramite Western-blot e mostrano una riduzione del clivaggio di Jagged1FL a valle del trattamento. (E) Hek 293 sono state trasfettate con combinazioni differenti di plasmidi codificanti per Jagged1IC-myc, RBP-Jk, MAML1-Flag e Notch3-IC HA. Gli estratti proteici sono stati sottoposti a saggi di immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo anti-myc e come mostrato dai vari blott Jagged1 è in grado di co-immunoprecipitare con i membri del complesso trascrizionale rappresentato da Notch3IC-HA, RBP-Jk e MAML1-Flag. Inoltre si può osservare che la formazione di male "maxi complesso" avviene via RBP-Jk. Le catene pesanti IgG sono utilizzate come controllo per la quantità di anticorpo utilizzato per immunoprecipitare. In tutti il vettore pcDNA3 è utilizzato come vettore vuoto.

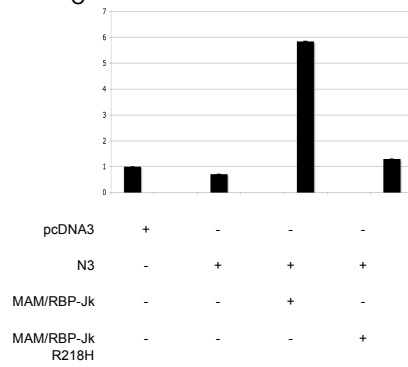
A



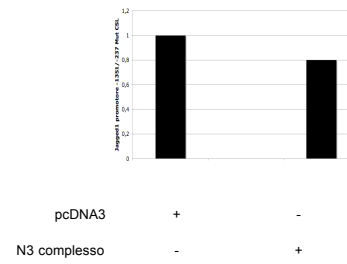
B

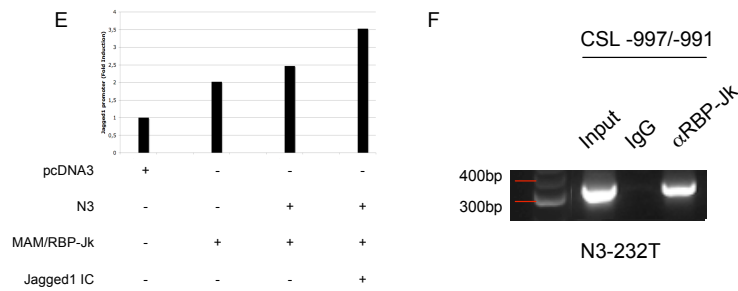


C



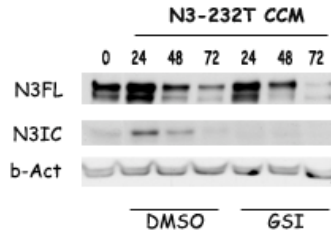
D



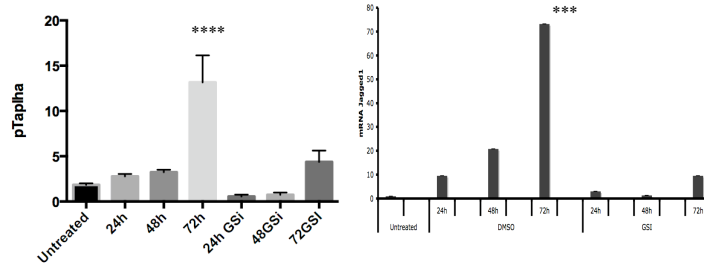


**Figura5 Jagged1 è target trascrizionale di Notch3 via RBP-Jk e di se stesso: (A)** clonaggio di due frammenti genici a monte del sito di inizio della trascrizione di 1638 bp (-3794/-2156bp) e di 1114 bp (-1351/-237 bp) inseriti in un vettore pGL3 Basic Vector rispettivamente tramite enzimi BglII/MluI e SacI/BglII; mutagenesi del sito CSL compreso tra -997/-991 bp; **(B)** saggio luciferasico in cellule Hek 293 utilizzando i due frammenti genici di cui sopra in presenza/assenza del complesso attivatorio di Notch3. Solo il frammento genico -1351/-237 bp è attivato di circa 4 volte rispetto al controllo; il frammento genico -3794/-2156 non è responsivo; **(C)** saggio luciferasico in cellule Hek 293 utilizzando diverse combinazioni di plasmidi sul gene reporter Jagged1 promoter -1351/-237bp in presenza/assenza di RBP-Jk R218H. L'attivazione del gene bersaglio mediata dal complesso attivatorio di Notch3IC è completamente abrogata in presenza del mutante puntiforme RBP-Jk R218H. **(D)** mutagenesi dell'unico sito CSL compreso tra -997/-991 bp a monte del sito di inizio della trascrizione del gene codificante per Jagged1; saggi di luciferasi in cellule Hek 293 confermano che l'alterazione del sito di legame per RBP-Jk riduce significativamente l'attivazione trascrizionale del promotore stesso mediata dal complesso trascrizionale di Notch3 via RBP-Jk; **(E)** saggio luciferasico in cellule preT 2017 utilizzando diverse combinazioni di plasmidi sul gene reporter Jagged1 promoter -1351/-237bp. È possibile osservare che il frammento Jagged1IC è in grado di attivare la trascrizione del suo stesso promotore prendendo parte al complesso di Notch3. In tutti i saggi luciferasici il plasmide pcDNA3 è utilizzato come vettore vuoto e controllo negativo; **(F)** analisi di PCR a valle di un saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) in cellule N3-232T utilizzando anticorpi specifici anti-RBP-Jk ed anti-Jagged1. Come mostrato RBP-Jk e Jagged1 sono in grado di legare il promotore Jagged1 -1351/-237bp nell'unico sito CSL compreso tra -997/-991bp. Le IgG sono utilizzate come controllo negativo.

A.

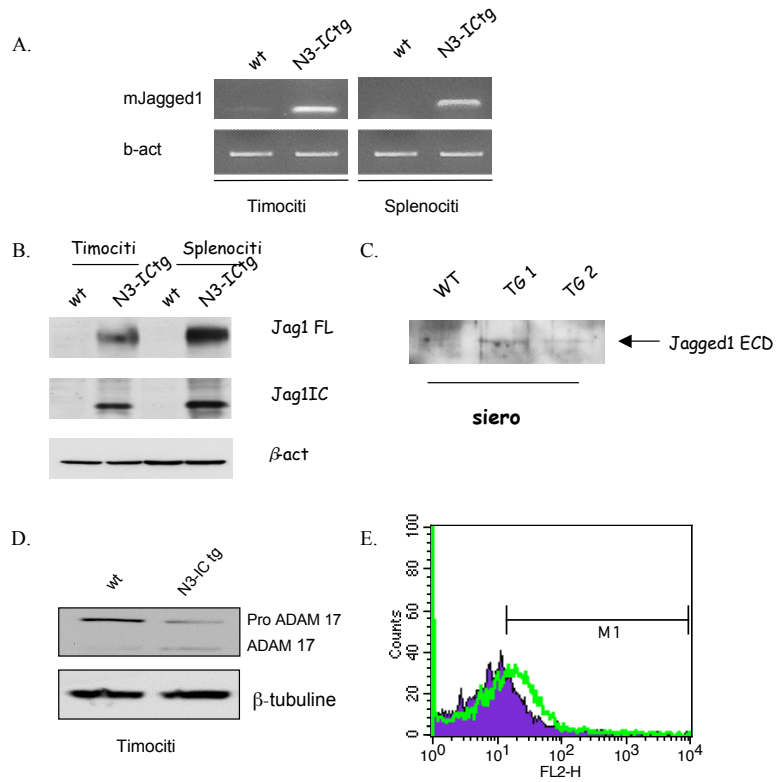


B.



**Figura6 Effetto paracrina di Jagged1 ECD: (A)** Saggio di Western blot su estratti proteici totali di timociti immaturi SCB29 mantenuti in coltura con il terreno di crescita cellulare condizionato dei timociti immaturi N3-232T in un *time course* di 24h, 48h e 72h; 12h prima del blocco del *time course* le cellule sono state trattate rispettivamente con GSI e DMSO di controllo; è possibile osservare che Jagged1 ECD presente nel mezzo di coltura condizionato delle cellule N3-232T è in grado di attivare il clivaggio di Notch3 FL, facilmente rivelabile dall'individuazione del frammento clivato N3IC; tutto ciò viene abolito in presenza di GSI che, bloccando il taglio proteolitico delle PS $\gamma$  secretasi inibisce la formazione del frammento solubile N3IC. La  $\beta$  actina è utilizzata come normalizzatore della quantità di proteine analizzate; **(B)** qRT-PCR sull'mRNA delle cellule SCB29 derivanti dal *time course* di cocultura con in terreno condizionato delle cellule N3-232T; è possibile osservare l'attivazione trascrizionale del gene bersaglio per eccellenza di Notch3 pT $\alpha$  (pannello di sinistra) e Jagged1 (pannello di destra) in relazione all'aumento del frammento Notch3IC liberato; il tutto è abrogato in presenza di GSI;





**Figura7 Espressione di Jagged1 nelle cellule linfomatose di topi transgenici Notch3 IC (A)** l'mRNA (B) estratti proteici totali estratti da timociti e splenociti di topi adulti Notch3IC transgenici (N3IC TG) e topi di controllo wilde type (WT) sono stati processati ed analizzato tramite RT-PCR utilizzando specifici primers. E tramite Western blott. Come mostrato i topi N3IC TG mostrano espressione dell'mRNA di Jagged1 se confrontati con i topi di controllo WT (A); aumentata espressione della proteina full-length e del suo clivaggio costitutivo, rappresentato dal rilascio del frammento solubile intracitoplasmatico Jagged1 IC (B) e dal frammento solubile corrispondente al frammento extracellulare di Jagged1 (Jag1ECD) rivelato nel siero dei topi (C); inoltre solo i topi N3IC TG mostrano la presenza della forma matura e attiva dello zimogeno ADAM17/TACE (D); la  $\beta$  actina e la  $\beta$  tubulina sono utilizzati come normalizzatori della quantità di proteina analizzata; in verde FACS analisi dell'espressione di Jagged1 nei timociti dei topi N3IC TG rispetto al controllo isotipico IgG, in viola (E).