

TRASDUZIONE DEL SEGNALE E LEUCEMOGENESI: DISREGOLAZIONE DELLE VIE JAK-STAT E RAS-MAPK NELLE LEUCEMIE ACUTE E NEI DISORDINI MIELOPROLIFERATIVI

Elisabetta Flex, Emilia Stellacci, Simone Martinelli, Valentina Fodale, Viviana Cordeddu, Eleonora Policicchio, Francesca Pantaleoni, Claudio Carta, Valentina Petrangeli, Silvia Delle Vigne, Valentina Muto, Luciano Cianetti, Marco Tartaglia
Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La trasduzione del segnale è un processo di trasferimento e integrazione dell'informazione necessario alla cellula per rispondere in maniera appropriata agli stimoli esterni. Nel contesto della singola cellula, le vie di trasduzione del segnale controllano virtualmente tutti i processi metabolici, così come lo stesso destino cellulare (divisione, sopravvivenza, differenziamento e morte). A un livello superiore, esse rappresentano il meccanismo attraverso cui le cellule coordinano lo sviluppo embrionale e la crescita dell'organismo. Non sorprende perciò che un numero sempre più cospicuo di malattie genetiche sia causato da alterazioni del flusso di segnalazione intracellulare, così come la disregolazione di una stessa via di trasduzione possa contribuire all'oncogenesi ed essere alla base di malattie dello sviluppo.

Negli ultimi 10 anni, l'attività di ricerca condotta dal nostro gruppo è stata diretta all'identificazione dei geni implicati in un gruppo di malattie dello sviluppo caratterizzate da suscettibilità all'insorgenza di neoplasie, le "RASopatie", alla comprensione dei meccanismi patogenetici sottostanti e allo studio del ruolo giocato da questi nuovi geni-malattia nella trasformazione neoplastica. Un secondo campo di ricerca è stato focalizzato sullo studio della via di traduzione del segnale mediata dalle proteine JAK nelle leucemie linfoblastiche acute.

Disregolazione della via di traduzione JAK-STAT nelle leucemie linfoblastiche acute

Le leucemie linfoblastiche acute (LLA [MIM 601626]) sono disordini che derivano dalla proliferazione ed espansione incontrollata delle cellule linfoblastiche immature, con un esito clinico estremamente variabile (1, 2). Numerosi studi condotti negli ultimi anni hanno reso possibile una maggiore comprensione degli eventi molecolari alla base della trasformazione leucemica, portando all'identificazione di una serie di marcatori prognostici e allo sviluppo di strategie terapeutiche mirate (2, 3). Tuttavia, nonostante i recenti progressi nel trattamento delle LLA in età pediatrica, la risposta alle terapie correnti rimane insoddisfacente negli adulti. Resta pertanto prioritaria, come requisito essenziale per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici, l'identificazione delle lesioni molecolari sottostanti questo gruppo di malattie.

I membri della famiglia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2) sono coinvolti nel controllo della proliferazione, della sopravvivenza e del differenziamento cellulare (4, 5). Sono proteine ad attività tirosin-chinasica che, in risposta alla stimolazione promossa da citochine e fattori di crescita ematopoietici, promuovono l'attivazione di diverse vie di segnalazione intracellulare, quali quelle

mediate dalle proteine STAT e quelle promosse dalle cascate RAS-MAPK e PI3K-AKT. In particolare, il gene *JAK1* codifica per una proteina associata non covalentemente a recettori di membrana per diverse citochine e svolge un ruolo non ridondante nella proliferazione e nel differenziamento dei precursori delle cellule linfoidi (6). Recenti studi del nostro gruppo hanno portato all'identificazione della disregolazione funzionale di JAK1 come nuovo evento patogenetico, con importante rilevanza clinica, nelle LLA (7). In particolare, le mutazioni somatiche attivanti di *JAK1* risultano essere associate a una scarsa risposta alla chemioterapia e a una prognosi generalmente infausta. Queste mutazioni ricorrono più frequentemente nelle LLA della linea T dell'adulto (20% dei casi), mentre mostrano una minore prevalenza nelle LLA della linea B dell'adulto e nelle LLA pediatriche (<5% dei casi). Le mutazioni oncogeniche di *JAK1* sono sostituzioni missenso che interessano diversi domini della proteina (Figura 1).

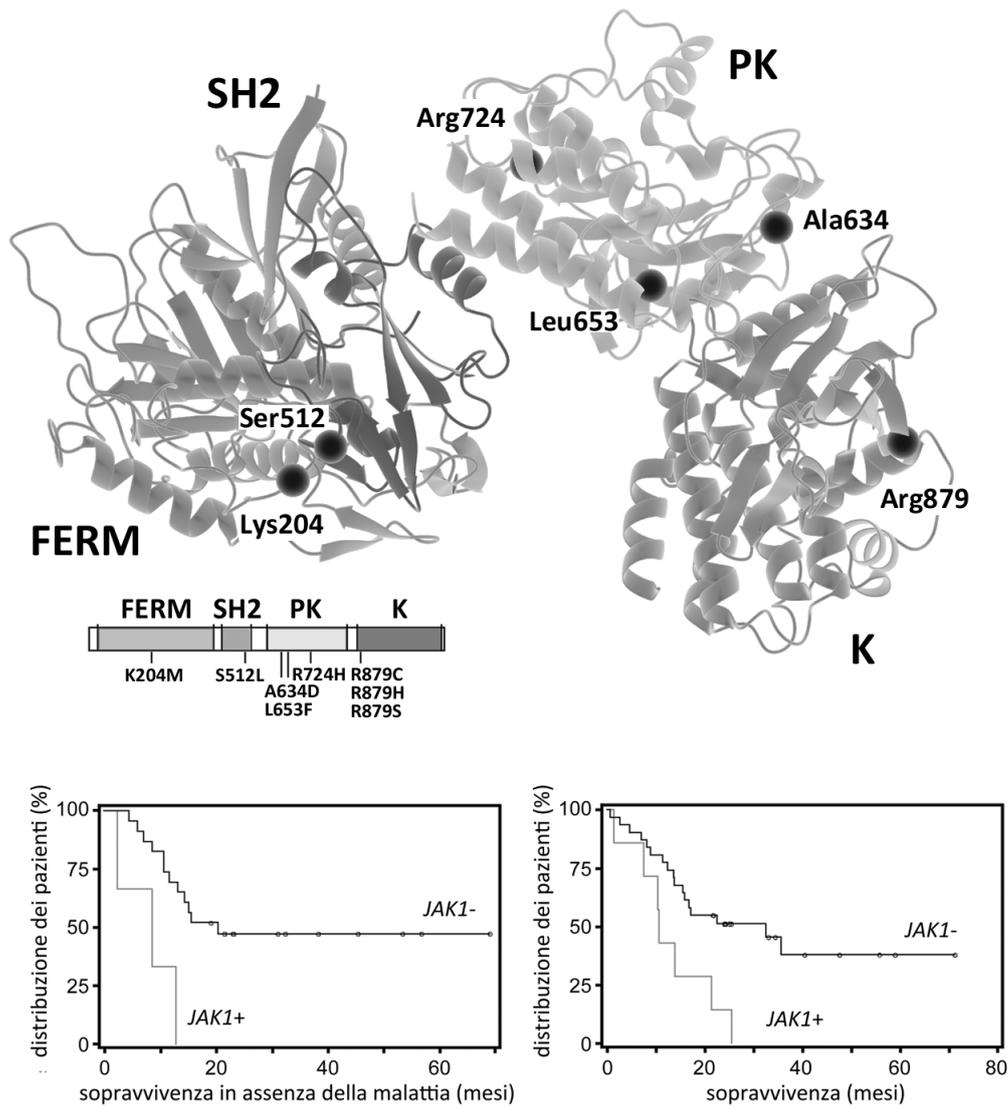


Figura 1. Mutazioni somatiche di JAK1 nelle leucemie linfoblastiche acute. Struttura della proteina JAK1 e localizzazione dei residui affetti dalle mutazioni

Le sostituzioni aminoacidiche sono riportate nella rappresentazione schematica della proteina con i propri domini funzionali, cioè FERM, SH2, pseudochinasico (PK) e chinasi (K). La localizzazione dei residui affetti dalle mutazioni è mostrata nel modello della struttura tridimensionale della chinasi (7). Sono riportate le curve di sopravvivenza (Kaplan-Meyer) per le coorti di pazienti con LLA negative e positive per le mutazioni somatiche di *JAK1*.

Studi di caratterizzazione biochimica e funzionale condotti su un pannello di queste lesioni geniche hanno permesso di stabilirne il ruolo attivante. È stato infatti dimostrato che queste mutazioni modulano positivamente la chinasi, con conseguente iperattivazione delle proteine STAT e delle cascate di segnalazione intracellulare RAS-MAPK e PI3K-AKT, e conferiscono proprietà trasformanti a linee cellulari modello (7).

Genetica delle RASopatie germinali e somatiche

I disordini mieloproliferativi costituiscono un gruppo di malattie ematologiche caratterizzate da un'umentata proliferazione di una o più linee cellulari della serie mieloide. Tra questi, la leucemia mielomonocitica giovanile (JMML [MIM 607785]) è caratterizzata da un'incontrollata espansione dei progenitori mieloidi iperresponsivi al fattore di crescita GM-CSF, ed è causata dalla disregolazione del flusso di informazione di segnalazione intracellulare attraverso la via di traduzione del segnale promossa dalle proteine RAS (8). In alcuni casi, la JMML può evolvere in leucemia mieloide acuta (LMA). Mutazioni nei geni che codificano questa piccola sottofamiglia di GTPasi monomeriche ricorrono nel 30% dei tumori umani e, in generale, l'iperattivazione di questa via, che può anche essere dovuta all'aumentata attività di trasduttori del segnale operanti a monte e a valle delle proteine RAS o all'inefficienza dei meccanismi di controllo negativo della stessa via di segnalazione, rappresenta l'evento molecolare più frequentemente osservato nella trasformazione neoplastica.

Diversi anni fa, il nostro gruppo ha dimostrato il coinvolgimento di una proteina ad attività tirosina-fosfatasi, SHP2, nella leucemogenesi (9). Tale scoperta rappresenta il primo esempio di una fosfatasi che assume un ruolo da oncoproteina quando mutata. SHP2 è un modulatore positivo di RAS caratterizzato da due domini SH2 disposti in tandem e da un singolo dominio catalitico.

La Figura 2 mostra il gene *PTPN11* e la sua proteina codificata. Gli asterischi identificano gli esoni affetti dalle mutazioni germinali e somatiche. Il numero degli asterischi è un indice della prevalenza relativa delle mutazioni lungo la porzione codificante del gene. I domini funzionali di SHP2 includono due domini SH2 (N-SH2 e C-SH2) disposti in tandem e un singolo dominio catalitico ad attività tirosina-fosfatasi (PTP). I residui affetti dalle mutazioni germinali (sinistra) e somatiche (destra) sono mostrati con le loro catene laterali nella struttura cristallografica della fosfatasi nella sua conformazione inattiva (18).

Questa fosfatasi media la trasduzione del segnale a valle di recettori per fattori di crescita, ormoni e citochine; la sua funzione è richiesta durante lo sviluppo embrionale e nell'ematopoiesi (10). Mutazioni germinali missenso nel gene codificante, *PTPN11* (MIM 176876), rappresentano la causa molecolare del 50% dei casi di sindrome di Noonan (SN [MIM 163950]) (11), una malattia dello sviluppo caratterizzata da bassa statura, dismorfismi facciali, difetti scheletrici e cardiovascolari, e da una predisposizione a sviluppare emopatie maligne, in particolare JMML (12). Gli studi condotti negli ultimi anni hanno permesso di stabilire che le mutazioni somatiche di *PTPN11* sono l'evento più frequente nella JMML e ricorrono, con diversa prevalenza, nelle leucemie dell'età pediatrica della linea mieloide e linfoide (9, 13-15), mentre rappresentano un raro evento nelle leucemie acute e nei disordini mieloproliferativi dell'adulto (16). Le mutazioni germinali (responsabili della SN) e somatiche (associate a leucemie) di *PTPN11* causano l'iperattivazione della fosfatasi e un flusso prolungato del segnale

lungo le vie di trasduzione controllate da RAS, ma rappresentano classi di lesioni molecolari distinte per le differenti conseguenze funzionali sulla proteina (17). Come per la maggior parte delle lesioni germinali associate a SN, le mutazioni somatiche oncogeniche di *PTPN11* sono sostituzioni missenso che coinvolgono prevalentemente residui aminoacidici localizzati all'interfaccia tra i domini N-SH2 e PTP della fosfatasi (Figura 2), la cui interazione è fondamentale per il mantenimento della proteina in una conformazione chiusa, cataliticamente inattiva (18). Studi biochimici e di dinamica molecolare hanno permesso di dimostrare che queste mutazioni promuovono un guadagno di funzione di SHP2 destabilizzando la conformazione cataliticamente inattiva della fosfatasi (12, 17).

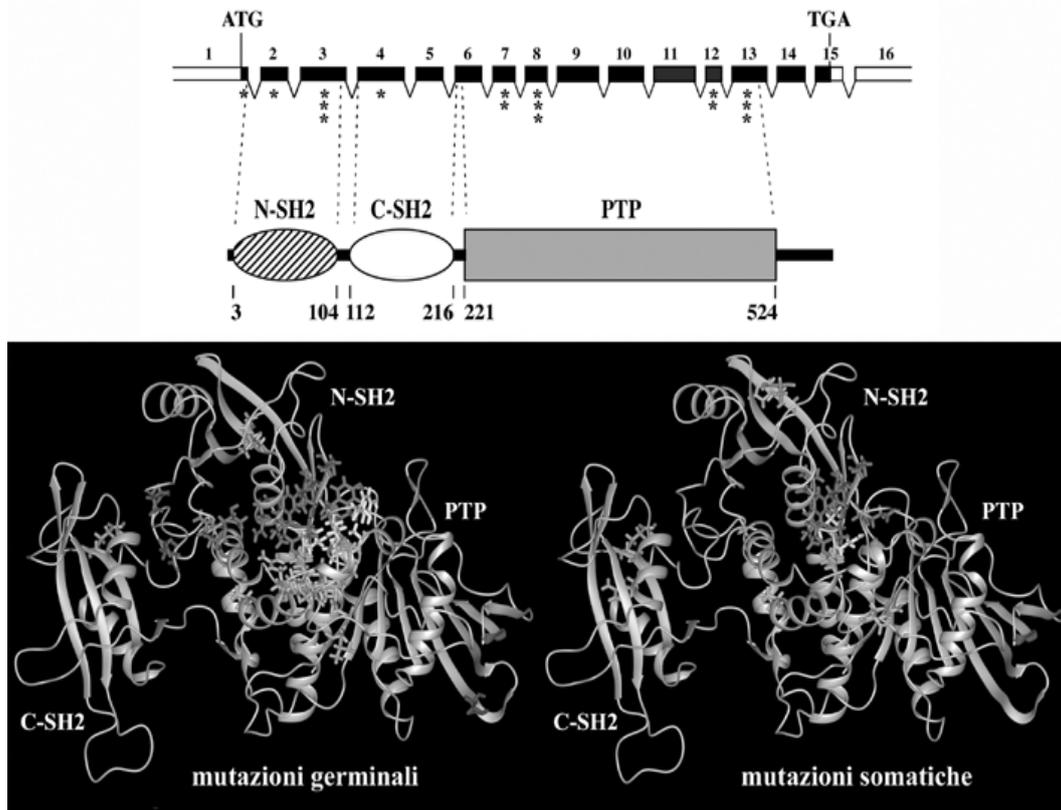


Figura 2. Il gene *PTPN11*, la proteina SHP2 e la localizzazione dei residui mutati

Stato di sviluppo

La disregolazione della via di trasduzione JAK-STAT nelle leucemie linfoblastiche acute

Gli studi attualmente in corso sono volti alla comprensione della rilevanza clinica e del significato biologico delle mutazioni somatiche di *JAK1*. L'attiva collaborazione con centri di eccellenza sul territorio nazionale (Andrea Biondi, Monza; Robin Foà, Roma) renderà possibile definire più precisamente il significato prognostico delle mutazioni, in termini di risposta alle terapie correnti, sopravvivenza e associazione ad altri difetti genetici. Inoltre, sebbene studi

preliminari suggeriscano il ruolo attivante delle mutazioni localizzate nei domini pseudochinasico (A634D e R724H) e chinasico (R879C), la comprensione dei meccanismi molecolari mediante i quali queste mutazioni alterano la funzione della proteina richiede ulteriori studi. Sulla base della complessa regolazione funzionale di JAK1 e del ruolo giocato dai domini FERM e SH2 nel controllo dell'attività della chinasi, ci si propone di caratterizzare il ruolo patogenetico delle mutazioni che colpiscono questi domini (K204M e S512L), che ipotizziamo possano avere una funzione destabilizzante sulla conformazione cataliticamente inattiva della proteina. In collaborazione con Emanuel Petricoin e Lance Liotta (George Mason University, Stati Uniti), sono stati recentemente attivati studi volti alla comprensione dell'effetto delle proteine mutanti sulla disregolazione delle vie di traduzione del segnale implicate nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare, attraverso approcci di fosfoproteomica. Una diversa linea di ricerca, condotta in collaborazione con Lorenzo Stella (Università "Tor Vergata", Roma) è rivolta alla determinazione della struttura cristallografica dei domini isolati con mutazioni oncogeniche, e alla caratterizzazione strutturale, biochimica e funzionale degli stessi domini mirata a valutare l'effetto promosso dalle mutazioni a livello dei meccanismi allosterici che controllano l'attività della chinasi. Infine, vista l'importanza della disregolazione del segnale mediato da JAK1 nella patogenesi e/o progressione delle LLA, stiamo conducendo uno screening mutazionale *high throughput* di un pannello di geni codificanti per proteine che partecipano alla trasduzione del segnale JAK-STAT, nell'ipotesi che altri geni funzionalmente correlati a *JAK1* possano essere coinvolti in questo gruppo di leucemie.

Genetica delle RASopatie germinali e somatiche

Gli studi in corso sono prevalentemente diretti a identificare nuovi oncogeni e oncosoppressori implicati nelle leucemie acute e nei disordini mieloproliferativi, e a esplorare il coinvolgimento dei geni-malattia sottostanti le RASopatie nell'oncogenesi. Una seconda linea di ricerca è volta alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della disregolazione funzionale di SHP2 dovuta a mutazioni germinali e somatiche di *PTPN11*. In particolare, approcci genomici diretti a sequenziare l'esoma di coorti selezionate di pazienti con emopatie maligne associate a condizioni sindromiche sono attualmente in corso per identificare nuovi geni implicati nelle RASopatie e con ruolo nella patogenesi della JMML e delle leucemie acute dell'età pediatrica. Approcci più tradizionali, basati su screening mutazionale di geni-malattia recentemente identificati e di nuovi geni candidati, sono attualmente in corso per esplorarne il coinvolgimento nello sviluppo e/o progressione neoplastica. Infine, studi biochimici, funzionali e di dinamica molecolare permetteranno di comprendere i diversi meccanismi implicati nella disregolazione funzionale di SHP2.

Conclusioni e prospettive future

Gli studi condotti hanno permesso di dimostrare che JAK1 è implicata nella patogenesi delle LLA. Le mutazioni somatiche di *JAK1* sono più frequenti fra gli adulti e coinvolgono preferenzialmente le cellule della linea T. Evidenze sperimentali suggeriscono che le mutazioni che coinvolgono i domini pseudochinasico e chinasico promuovono una iperattivazione della proteina e del *signaling* intracellulare. Complessivamente, questi risultati sottolineano l'importanza della disregolazione delle vie mediate dalle chinasi JAK nella leucemogenesi e

allargano lo spettro dei tumori ematologici associati all'attivazione aberrante di questa famiglia di trasduttori del segnale.

Le ricerche condotte negli ultimi anni hanno permesso di identificare nuovi meccanismi molecolari responsabili della disregolazione della trasduzione del segnale mediato dalle proteine RAS con ruolo in patologia umana. Queste scoperte, da un lato hanno consentito di comprendere le cause genetiche di un gruppo di malattie dello sviluppo caratterizzate da suscettibilità all'insorgenza di leucemie e tumori solidi dell'età pediatrica, dall'altro hanno portato alla scoperta di nuovi oncogeni implicati nella leucemogenesi. Nel complesso, i dati genetici, biochimici e funzionali suggeriscono un modello in cui il grado di iperattivazione della proteina mutata è direttamente correlato al fenotipo osservato, in termini di alterazione dei programmi morfogenetici e di sviluppo, e di contributo alla trasformazione neoplastica. In accordo con questo modello, le mutazioni di SHP2 responsabili della SN promuovono un guadagno di funzione della proteina sufficiente a perturbare processi biologici strettamente modulati da SHP2, come quelli implicati nello sviluppo embrionale, ma non in grado di alterare significativamente processi più debolmente controllati dalla fosfatasi, come la proliferazione e la sopravvivenza dei precursori ematopoietici. Questi ultimi processi sarebbero compromessi solo in seguito al superamento di una più alta soglia di attivazione di SHP2, come osservato nel caso delle mutazioni oncogeniche acquisite per via somatica. L'osservazione che queste mutazioni non siano mai presenti come eventi germinali suggerisce, infine, che esse siano incompatibili con lo sviluppo embrionale o con la sopravvivenza fetale.

Gli obiettivi a breve, medio e lungo termine dei progetti in corso sono l'identificazione di nuovi oncogeni e oncosoppressori implicati nella leucemogenesi e di nuovi geni-malattia responsabili delle RASopatie, così come la comprensione dei meccanismi molecolari sottostanti la patogenesi di queste malattie. Il raggiungimento di questi obiettivi ha importanti ricadute cliniche in termini di diagnosi, gestione del paziente, consulenza genetica, e sviluppo di nuove terapie.

Bibliografia

1. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:6306-15.
2. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:166-78.
3. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, *et al.* Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133-43.
4. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 2004;5:253.
5. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007;282:20059-63.
6. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998;93:373-83.
7. Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, Ariola C, Fodale V, Clappier E, Paoloni F, Martinelli S, Fragale A, Sanchez M, Tavolaro S, Messina M, Cazzaniga G, Camera A, Pizzolo G, Tornesello A, Vignetti M, Battistini A, Cavé H, Gelb BD, Renauld JC, Biondi A, Constantinescu SN, Foà R, Tartaglia M. Somaticly acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2008;205:751-8.

8. Niemeyer CM, Kratz CP. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options. *Br J Haematol* 2008;140:610-24.
9. Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, Hählen K, Hasle H, Licht JD, Gelb BD. Tartaglia M, Niemeyer CM, Shannon KM, Loh ML. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2003;34:148-50.
10. Tartaglia M, Niemeyer CM, Shannon KM, Loh ML. SHP-2 and myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol* 2004;11:44-50.
11. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, van der Burgt I, Crosby AH, Ion A, Jeffery S, Kalidas K, Patton MA, Kucherlapati RS, Gelb BD. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;29:465-68.
12. Tartaglia M, Gelb BD. Germ-line and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Eur J Med Genet* 2005;48:81-96.
13. Tartaglia M, Martinelli S, Cazzaniga G, Cordeddu V, Iavarone I, Spinelli M, Palmi C, Carta C, Pession A, Aricò M, Masera G, Basso G, Sorcini M, Gelb BD, Biondi A. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood* 2004;104:307-13.
14. Tartaglia M, Martinelli S, Iavarone I, Cazzaniga G, Spinelli M, Giarin E, Petrangeli V, Carta C, Masetti R, Aricò M, Locatelli F, Basso G, Sorcini M, Pession A, Biondi A. Somatic PTPN11 mutations in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005;129:333-39.
15. Loh ML, Vattikuti S, Schubbert S, Reynolds MG, Carlson E, Lieu KH, Cheng JW, Lee CM, Stokoe D, Bonifas JM, Curtiss NP, Gotlib J, Meshinchi S, Le Beau MM, Emanuel PD, Shannon KM. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. *Blood* 2004;103:2325-31.
16. Loh ML, Martinelli S, Cordeddu V, Reynolds MG, Vattikuti S, Lee CM, Wulfert M, Germing U, Haas P, Niemeyer C, Beran ME, Strom S, Lübbert M, Sorcini M, Estey EH, Gattermann N, Tartaglia M. Acquired PTPN11 mutations occur rarely in adult patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res* 2005;29:459-62.
17. Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, Zampino G, Burgt I, Palleschi A, Petrucci TC, Sorcini M, Schoch C, Foa R, Emanuel PD, Gelb BD. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet* 2006;78:279-90.
18. Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 1998;92:441-50.