

GIUSEPPE AMADORI (*)

IL RUOLO DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE E DEGLI ONCOGENI NELL'EMOPOIESI NORMALE

ABSTRACT - AMADORI G., 1997 - The role of the transcription's factors and oncogenes in the normal hematopoiesis.

Atti Acc. Rov. Agiati, a. 247, 1997, ser. VII, vol. VII, B: 81-114.

Correct regulation of gene expression, so that specific proteins are made by the appropriate organs at the appropriate times or in response to specific signals, is essential to both normal development and to the correct function of the adult organism. Such regulation is usually achieved at the level of DNA transcription, a process that controls which genes are transcribed into RNA by the enzyme RNA polymerase, although regulation can also occur after transcription.

How external growth signals are transmitted from the surface of the cell to the nucleus is one of the fundamental problems of cell biology. It is well-known that hematopoiesis is the process by which blood cells acquire definite phenotypes as the result of coordinated, cell-specific gene expression. Within the hematopoietic cells, the pattern of gene expression is established by cell-specific transcription factors that mediate the net effects of a variety of proliferation and differentiation signals which impinge on it. Studies in this area have been facilitated by advances in mouse genetic techniques, such as the gene knock-out. Selection between alternate lineages likely involves both activation and silencing of distinct subsets of genes. The competing activities of various transcriptional regulators may be of crucial importance. It is described how oncogenes and transcription factors influence the normal hematopoiesis in mammals.

KEY WORDS - Transcription's factors, Oncogenes, Erythropoiesis, Myelopoiesis, Lymphopoiesis.

RIASSUNTO - AMADORI G., 1997 - Il ruolo dei fattori di trascrizione e degli oncogeni nell'emoipoesi normale.

Sia il normale sviluppo che le corrette funzioni fisiologiche di un organismo adulto richiedono l'appropriato controllo dell'espressione genica in modo che determinate proteine siano sintetizzate in seguito a precisi segnali, in certi organi ed in precisi

(*) Professore Associato in Ematologia dell'Università di Padova.

momenti. Esso viene per lo più esercitato a livello della trascrizione, un processo che regola la scelta dei geni che verranno trascritti in RNA da parte dell'enzima RNA-polimerasi, anche se talvolta può avvenire a livello post-trascrizionale. Uno dei problemi fondamentali della biologia cellulare è il modo attraverso il quale un segnale per la crescita proveniente dall'esterno viene trasmesso dalla superficie cellulare al nucleo. Per quanto riguarda l'emopoiesi, si sa che essa fondamentalmente consiste nell'acquisizione da parte delle cellule midollari di un determinato fenotipo come risultato di espressione genica cellulo-specifica e coordinata. Nelle cellule del sangue la modalità di espressione genica è stabilita da fattori di trascrizione specifici i quali mediano l'effetto di moltissimi segnali alla proliferazione e alla differenziazione. Gli studi in questo campo sono stati resi possibili nell'animale da esperimento da tecniche avanzate di biologia molecolare, quali l'annullamento genico. Si è così visto che la differenziazione verso una certa filiera coinvolge geni sia attivanti che repressivi la trascrizione. Si descrive l'importanza e la funzione di alcuni geni per fattori di trascrizione essenziali per l'emopoiesi normale e patologica.

PAROLE CHIAVE - Fattori di trascrizione, Oncogeni, Eritropiesi, Mielopoiesi, Linfopoiesi.

Uno dei problemi centrali dell'ematologia riguarda le regole che soprassedono al corretto sviluppo del midollo e, in particolare, i meccanismi molecolari attraverso i quali da una cellula multipotente originano, attraverso mitosi e progressiva differenziazione, tutti gli elementi maturi del sangue periferico. Differenziazione significa espressione diversa, sequenziale e parziale del codice genetico, rappresentato in tutte le cellule.

L'ordine e la regolazione della trascrizione sono punti di controllo fondamentali per l'espressione genica. A questi sovrintendono delle particolari molecole chiamate «fattori di trascrizione», proteine che riconoscono e legano specificamente sequenze regolanti geni attraverso «domini», cioè tratti di sequenze aminoacidiche con definite proprietà funzionali e configurazione sterica. Attivati a loro volta da stimoli esogeni ed endogeni, i fattori di trascrizione portano segnali a geni di una specifica via di differenziazione legandosi ad enhancers, stabilendo quali di essi saranno attivamente usati da una cellula in un particolare momento dello sviluppo. In base alla struttura tridimensionale, oggi nota grazie all'analisi cristallografica con raggi X, e allo studio delle sequenze aminoacidiche, essi vengono distinti in alcuni gruppi (1).

La doppia elica del DNA presenta due tipi di incavo, il maggiore ed il minore, ove penetrano i fattori di trascrizione. La peculiarità delle cariche elettriche e le dimensioni degli incavi sono determinate dalla sequenza delle basi azotate. Va osservato che un dominio di un fattore di trascrizione può riconoscere e legare tratti molto brevi di DNA, fino a tre coppie di basi, ovviamente con conseguente scarsa specificità a

causa del grande numero di tratti brevi eguali presenti nelle regioni enhancer del genoma. La specificità di legame richiede invece rapporti con tratti lunghi oppure con più domains presenti nello stesso fattore di trascrizione.

La maggior parte dei geni in un definito momento della vita è silente e non dà pertanto luogo a proteine. All'interazione tra fattori di trascrizione e sequenze DNA enhancers segue l'attivazione del cosiddetto «complesso trascrizionale», costituito da vari enzimi tra cui la RNA-polimerasi, il quale presenta molti elementi comuni nell'intero genoma, in modo che un numero relativamente limitato di proteine regolatrici della trascrizione controlla un grande numero di geni (fig. 1).

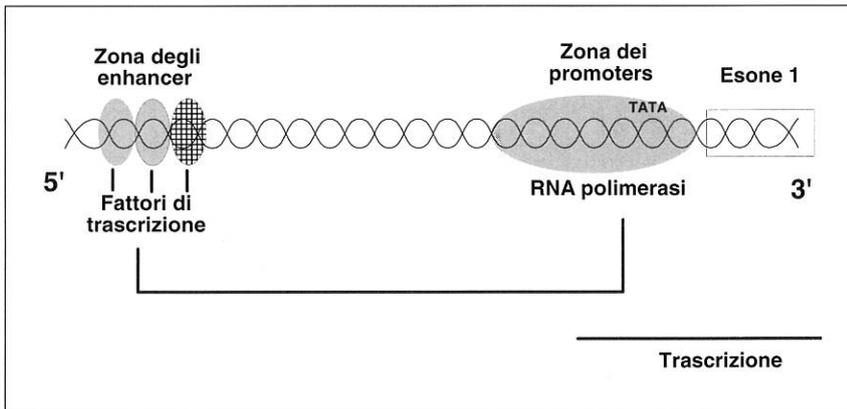


Fig. 1 - Le sequenze di DNA che influenzano la trascrizione genica sono situate «upstream» rispetto al gene. Non codificano per proteine. In esse distinguiamo la zona dei promotori, vicina al primo esone, con frequente presenza di sequenze TATA, dove si forma il complesso transizionale dopo legame della RNA polimerasi e di altri fattori; ed una zona degli «enhancers», più lontana, alla quale si legano fattori di trascrizione. Si ritiene che questa zona possa attivare i promotori avvicinandosi ad essi con la formazione di anse.

La differenziazione cellulare è determinata dall'azione complessa di proteine di controllo specifiche di un tessuto o diffusamente rappresentate, che possono acquisire maggiore specificità unendosi tra loro in eterodimeri. La sequenzialità dei processi differenziativi deriva dall'azione successiva del prodotto di un gene su un altro gene.

Delle varie caratteristiche dei regolatori di trascrizione, quelle più frequentemente usate per la classificazione in famiglie riguardano la presenza di particolari domini funzionali. Alcuni di essi presentano azione attivante la trascrizione, altri, di regola alcalini, proprietà leganti

il DNA, altri infine favorenti la dimerizzazione con proteine eguali o diverse (omo- ed eterodimerizzazione). Fattori di trascrizione che non possiedono un dominio trascrizionale attivante, quali la proteina *MAX*, che comprende un motivo elica-ansa-elica alcalino (*bHLH*) ed uno a cerniera leucina («leucine zipper, *L.Z.*), formano tuttavia eterodimeri (2). Molti di essi presentano però contemporaneamente strutture caratterizzanti differenti e pertanto vengono indicati in base a quella prevalente. A puro titolo esemplificativo si propone la seguente

Tab. I - Classificazione dei fattori di trascrizione

| <i>CON bHLH</i> | <i>CON ZINC FINGER</i> |
|--------------------|--------------------------------|
| C-MYC | RICETTORI PER ORMONI STEROIDEI |
| E12, E47 | RICETTORI PER ORMONI TIROIDEI |
| TAL1 | RICETTORI PER VIT. D E RARs |
| LYL1 | PML |
| | MZF-1 |
| <i>CON LIM</i> | EVI1 |
| TTG1 | TFIIIA |
| TTG2 | NF-E2 |
| | GATA-1 |
| <i>CON HOMEBOX</i> | EKLF |
| PBX | SP1 |
| HOX11 | |
| HOX 2.3 | <i>CON LEUCINE ZIPPER</i> |
| HOX 2.4 | FOS |
| | JUN |

Il meccanismo di controllo della trascrizione risulta difficilmente spiegabile allorchè il fattore di trascrizione legghi elementi enhancer (cioè favorenti la lettura di un gene) lontani migliaia di basi dal gene strutturale. In questo caso vengono ipotizzati ripiegamenti con avvicinamento della zona degli enhancer a quella promoter e quindi attivazione del complesso trascrizionale.

I domini di attivazione dei fattori di trascrizione causano alterazioni strutturali di vari componenti dell'apparato trascrizionale generando un complesso attivo. Il primo evento consiste abitualmente nel legame tra fattori ubiquitari quali i *TBP* (TATA binding protein) e sottotipi del *TFII* (transcription factor, A, B, D, E, F, H, J) con brevi sequenze di DNA al di quà del box TATA. Il processo si completa con l'attivazione

della RNA-polimerasi II attraverso reazioni successive con vari fattori attivanti.

Il box TATA, al quale si riconosce attività regolatrice limitata, fa parte della regione promoter di moltissimi geni ed è situato all'incirca a -30 triplette dal primo esone di un gene.

La prima classe di fattori di trascrizione identificata sul piano strutturale biochimico è quella appunto delle proteine «*bHLH*», che presentano sequenze aminoacidiche con due eliche separate da un'ansa di varia lunghezza. Questo dominio è stato dapprima riconosciuto nella sequenza di 61 aminoacidi caratterizzante gli omeodomini, di cui si parlerà in seguito.

Esso facilita il legame dell'intero fattore di trascrizione con il DNA per la natura alcalina e per la conformazione elicoidale, caratteristica comune di fattori di trascrizione anche di classe diversa (fig. 2).

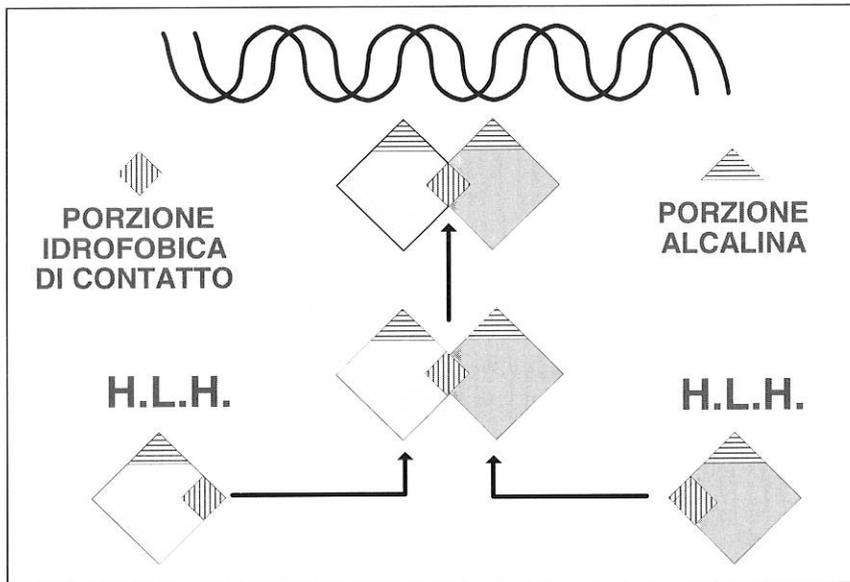


Fig. 2 - Rappresentazione schematica della formazione di un fattore *bHLH* e del suo legame con l'incavo maggiore del DNA.

I fattori «*bHLH*» formano omeodimeri ed eterodimeri attraverso interazioni tra residui idrofobici posti sui lati corrispondenti delle due eliche. All'ansa spetta il ruolo di consentire alle eliche di reagire in maniera indipendente. Alcune di queste proteine sono ubiquitarie, come *E12/E47*, mentre altre sono espresse in modo tessuto-specifico, come la *MYO-D*, importante nella differenziazione muscolare (3).

Un altro motivo caratteristico di alcuni fattori di trascrizione, responsabile della formazione di dimeri e del legame con il DNA, è il cosiddetto *L.Z* («leucine zipper»). La molecola in questo caso ha forma di Y con configurazione ad α -elica anfifatica. I fattori *L.Z.* rappresentano domini all'interno di proteine leganti il DNA nei quali esistono sequenze di aminoacidi con residui leucinici rappresentati in modo periodico, esattamente ogni sette aminoacidi, sporgenti allo stesso lato della catena e legantisi con analoghi radicali di un'altra catena. La regione proteica adiacente a quella ricca di leucina è molto alcalina e comprende motivi leganti il DNA (fig. 3).

I motivi «leucine zipper» sono frequenti in *FOS*, *JUN* a *AP1* (vedi in seguito).

I fattori *Z.F.* («zinc finger») rappresentano una famiglia di proteine leganti il DNA che contengono aminoacidi avvolti in una singola unità strutturale attorno ad un atomo di zinco che lega due cisteine e due istidine. Si ritiene che ogni «finger» riconosca sequenze specifiche costituite da circa cinque paia di nucleotidi (4, 5, 6) (fig. 4). Contengono motivi *Z.F.* recettori ormonali di fondamentale importanza che agiscono su numerosi geni: ricordiamo quelli per gli steroidi, per gli ormoni tiroidei, per i retinoidi e per la vitamina D (VDR) (7). Nei tessuti emopoietici quest'ultimo è espresso in monociti, macrofagi e linfociti attivati ed alcuni sottotipi di timociti. Agendo attraverso il VDR la 1,25(OH)2D3 modula la produzione di un grande numero di prodotti di linfociti, monociti e di cellule dello stroma midollare, comprese alcune interleuchine, citochine, e fattori di trascrizione.

I linfociti posseggono anche una proteina del citosol di 80kD, da poco conosciuta, che presenta cross-reattività immunologica con il VDR e come esso ha domini *Z.F.* Essa risponde al 1,25(OH)D3, che è potente agente della differenziazione di cellule della linea mieloide e stimola inoltre la fusione e la differenziazione di progenitori emopoietici in osteoclasti. Favorisce la differenziazione da granuloblasti a monociti/macrofagi agendo a livello di promielocita (8). Questa proteina è indotta dall'attivazione ed è sottoregolata dalla vitamina, mentre il VDR è sovraregolato dal 1,25(OH)2D3 (9).

Si è anche visto che l'1,25(OH)D3 regola l'unità di 50 kDA legante il DNA del fattore di trascrizione pleiotropico *NF-KB* ed il precursore di 105 kDA di questa subunità, importante, come si vedrà tra poco, per la regolazione della risposta immune, ed anche altri membri della correlata famiglia di proteine *REL*, compreso il *V-REL* ed il suo omologo cellulare *C-REL*, in linfociti umani normali attivati.

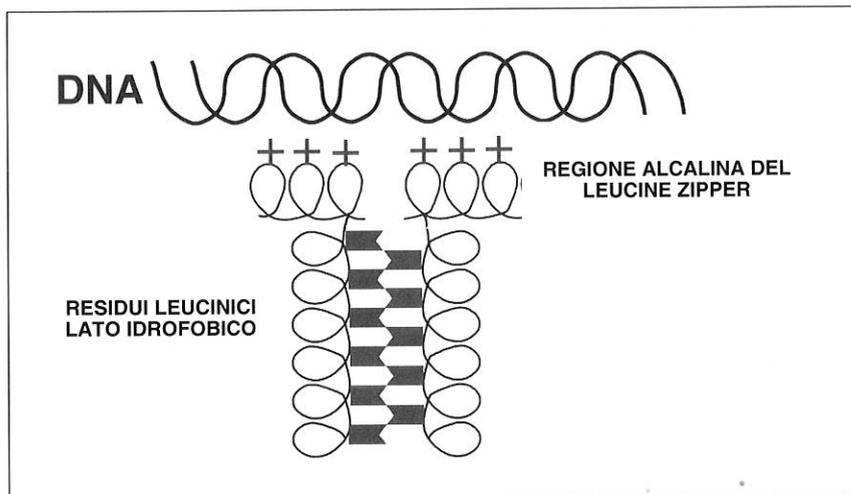


Fig. 3 - Struttura di un fattore di trascrizione «leucine zipper». I residui leucinici rendono possibile la dimerizzazione essendo esposti regolarmente dallo stesso lato dell' α -elica. La parte a valle, alcalina, lega il DNA nell'insenatura maggiore.

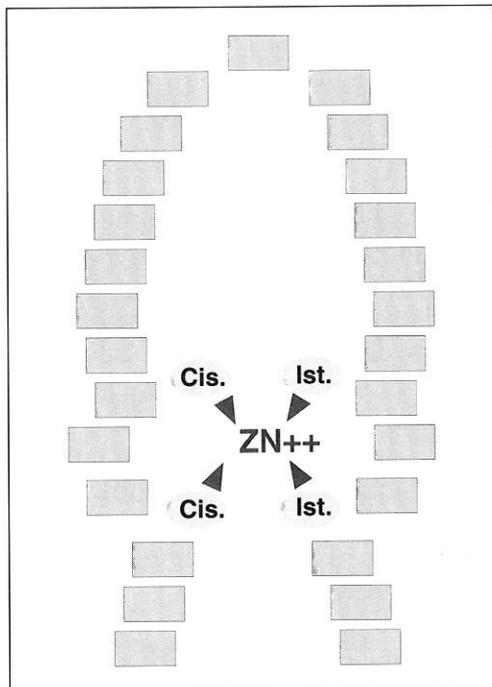


Fig. 4 - Conformazione di uno Z.F.
- Il legame dello jone zinco con strutture ripetitive contenenti cisteina e istidina dà luogo alla particolare configurazione sterica denominata «zinc finger».

FATTORI DI TRASCRIZIONE E CONTROLLO DELLA MIELOPOIESI

Geni e fattori importanti: PU-1/NF β A, SPI-1, C-FMS, C-MYB, NF-M, MIM-1, M2F-1, MNDA.

Il ruolo dei fattori di trascrizione che intervengono nella maturazione della linea granulocitica-monocitica è meno conosciuto rispetto alle altre filiere ematologiche. Sicuramente importante è il *PU.1/NF- β A*, membro della famiglia *ETS*, prodotto del proto-oncogene *SP1*, identificato nel sito della mutagenesi inserzionale del virus di Friend e Rauscher nell'eritroleucemia murina. Il *PU.1* trova nell'uomo un sito di legame nella regione promoter di *C-FMS*, gene del recettore per M-CSF (monocyte-colony stimulating factor) (10) favorendo pertanto la maturazione monocitaria, mentre reprime enhancers per IgH (catene pesanti immunoglobuliniche) bloccando la differenziazione B-linfocitaria (11).

La proteina *PU.1* è necessaria anche per la corretta differenziazione multilineare dell'emopoiesi, come dimostrato dai gravi difetti osservati in topi con gene mutante, i quali non producono granulociti, monociti, linfociti T e B e muoiono pochi giorni dopo la nascita (12). La sua espressione è parzialmente inibita dall'interferone γ e dall'acido retinoico (13). Blocca altresì la differenziazione eritroide (14).

m-RNA per *PU.1* è dimostrabile in precursori mieloidi primordiali nei quali il fattore si lega a siti in regioni '5 del gene CD34 e CD11b (15), mentre nei granulociti non è presente. Il fattore consente l'espressione massimale del gene per la catena β dell'interleuchina 1 (Il-1- β) legandosi ad una sequenza altamente conservata localizzata 6bp al di là del motivo TATA entro il promoter (16).

Alcuni di questi siti di legame per *PU.1* sono in prossimità di sequenze leganti il prodotto del proto-oncogene *C-MYB*, omologo cellulare del virus *V-MYB* della mieloblastosi aviaria, nella quale sono trasformate solo cellule mieloidi, che similmente regola l'espressione di CD34 (17). Il fattore di trascrizione da esso prodotto si localizza nel nucleo dove lega sequenze AACG/TG e influenza la differenziazione di cellule non solo mieloidi, ma anche eritroidi e linfoidi (18), tant'è che la prima dimostrazione del riarrangiamento del suo promoter è stata fatta in una linea di leucemia linfatica acuta T (19). La distruzione (knock-out) del gene ha per conseguenza marcato ritardo dell'emopoiesi fetale con normale numero di megacariociti, scarsa maturazione degli eritroblasti e mielopoiesi e linfoiesi aberranti.

In certi casi di leucemia mieloide cronica Filadelfia- bcr- è stata osservata elevata espressione contemporaneamente di *C-ABL* e *C-MYB*, i quali coopererebbero nella patogenesi (20). Il secondo blocca il

promoter per i macrofagi frenando l'azione di *C-ETS1*, fattore importante nell'angiogenesi neoplastica, nell'attivazione di u-PA e della collagenasi I (21), che assieme a *PU.1* è in grado di transattivare il promoter di *C-FMS* (22). Si intende per transattivazione l' aumentata espressione genica diretta da proteine virali o cellulari. Questi fattori regolatori (prodotti genici diffusibili) agiscono in trans, cioè su molecole di DNA omologhe o eterologhe (in cis solo se omologhe).

L'attivazione di *C-MYB*, che frena la differenziazione mieloida a livello di granuloblasti in stadio di media maturazione, ma che ha anche la funzione di regolare proliferazione e differenziazione di diverse filiere (23, 24), porta a trasformazione neoplastica soprattutto cellule mieloidi. È in grado di legarsi come fattore trascrizionale all'enhancer del gene *MIM-1*, specifico dei promielociti, inducendo in tale modo espressione di marcatori mieloidi anche in cellule di altra natura, come le eritroidi o le fibroblastiche (25). Accanto a questo gene esiste un sito di legame per il fattore di trascrizione *NF-M/EPB β /NF-IL6/LAP/CRP*, termini sinonimi, presente in molti tessuti, comprese le cellule mieloidi, e analogamente al *C-MYB* capace di indurre l'espressione di marcatori mieloidi in altre linee ematologiche (26).

Il *C-MYB*, come il *C-MYC*, è normalmente espresso in mieloblasti proliferanti. In queste cellule la sovraespressione del secondo blocca la differenziazione a livello di macrofago di media maturazione.

In cellule mielomonocitiche risulta preferenzialmente espresso il trascritto del gene homeobox *HOX A10*, la cui funzione non è nota (27).

Il fattore di trascrizione mieloida *MZF-1*, appartenente al gruppo degli *Z.F.*, è espresso preferenzialmente in cellule di leucemia mieloida e in progenitori mieloidi normali del midollo. Oligonucleotidi antisense inibiscono la formazione di colonie granulocitarie ma non eritrocitarie, con il meccanismo di azione rappresentato nella fig. 5. Ha due domini leganti il DNA, con 4 e 9 domini *Z.F.*, i cui siti consensus nel DNA sono stati identificati nelle regioni promoter di alcuni geni espressi in modo diverso nel corso della differenziazione mieloida, compreso il *CD34* (28, 29).

Curiosamente le capacità regolatrici la trascrizione di *MZF-1* dipendono dall'ambiente intracellulare, in quanto se viene espresso in cellule non-emopoietiche agisce da repressore, mentre in cellule emopoietiche è attivatore. Esiste un sito di legame per *MZF-1* anche nel promoter del gene per la mieloperossidasi (4).

Fattori di trascrizione ancora non ben tipizzati, di origine linfocitaria, stimolano la proliferazione di precursori granulocitari e macrofagici attivando il gene per GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), che normalmente non è espresso ma lo diviene in

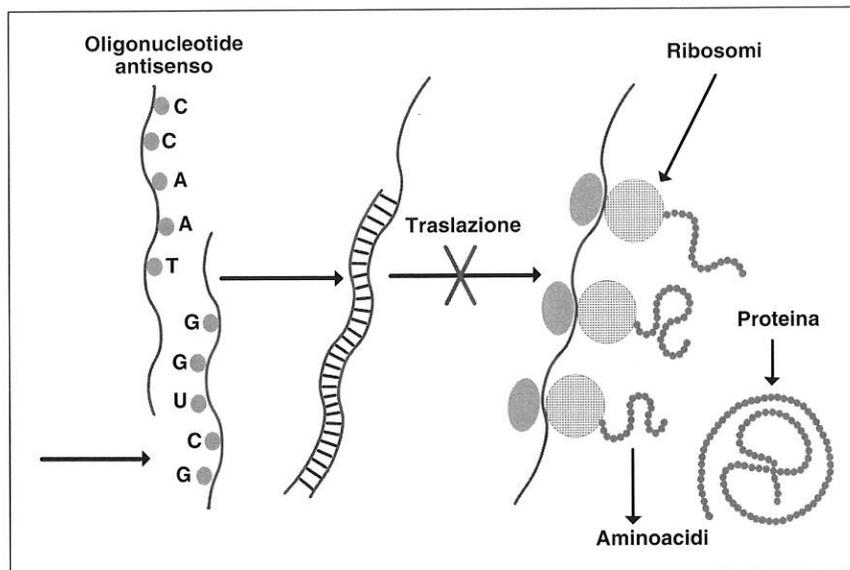


Fig. 5 - Schema illustrativo del meccanismo di azione degli oligonucleotidi antisenso, che si legano al RNA messaggero e ne prevengono la traslazione favorendo la sua degradazione precoce.

seguito a legare di un suo enhancer con un complesso proteico di origine T-linfocitaria con funzione di regolatore della trascrizione (probabilmente fattori del tipo *ETS* o *AP-1*) (30).

L'antigene mieloide di differenziazione nucleare (*MNDA*) è espresso specificamente in monociti e granulociti umani ed in stadi precoci di linee mieloidi. Il gene è situato su 1q21-22. Una regione di 200 aminoacidi è del tutto simile ad un dominio di altra proteina inducibile nel topo dall'interferon. Anche l'*MNDA* umano fa parte di una famiglia di proteine regolate dall'interferon, limitate a cellule emopoietiche. L'azione della citochina nell'induzione del gene è più pronunciata a livello di monociti maturi (31, 32).

FATTORI DI TRASCRIZIONE E CONTROLLO DELL'ERITROPOIESI

(*Geni e fattori importanti: GATA-1/ERYF-1/NF-E1/GF-1, SCL/TAL-1, NF-E2, EKLf.*

Si ritiene che nel corso dello sviluppo dell'eritrone l'espressione dei geni caratteristici della linea sia regolata da una serie di fattori di trascrizione generalmente transattivanti e non necessariamente eritroide-

specifici, ma che tali diventano dopo combinazioni con altri (33). I più noti sono il *GATA-1/ERYF-1/NF-E1*, il *SCL/TAL-1*, il *NF-E2* e l'*EKLF* (erythroid Krüppel-like factor).

Accanto ai cluster di geni per le catene α e β sui cromosomi 11 e 16 esistono delle cosiddette «locus control region» (*LCR*), siti ipersensibili assai importanti per l'espressione dei geni globinici, come è dimostrato dalla $\gamma\delta\beta$ talassemia che compare in seguito a delezione di tali loci. Esercitano la loro azione in modo specifico riguardo alla linea e al tempo, attivati da fattori di trascrizione diversi.

Il *GATA-1* è un fattore *Z.F.* appartenente ad una famiglia i cui membri hanno un ruolo fondamentale nel controllo dell'emopoiesi. Attualmente ne sono noti 6, con patterns di espressione distinti ma in parte sovrapposti.

La proteina prodotta dal gene *GATA-1*, primo della famiglia ad essere isolato, sito sul cromosoma X, si lega a siti di enhancer di geni globinici, del gene per il recettore dell'eritropoietina (*EPOR*) e allo stesso gene *GATA-1*. *EPOR* è attivato anche da *AP-1* (activator protein 1, eterodimero costituito da proteine *C-FOS* e *C-JUN*, importante anche nello sviluppo di altri tessuti quali cervello e surrene) e *AP-2* (activator protein 2) (34, 35). La sua assenza in topi chimerici si accompagna ad abolizione di produzione eritrocitaria, mentre forme mutanti sono responsabili di *HPPH* (persistenza di emoglobina fetale nell'adulto) (36) e di delta-talassemia (37), per evidente sovvertimento nell'attivazione di geni globinici. *GATA-1* assieme a *NF-E2* attiva le regioni *LCR* α e β (38) in una azione coordinata che coinvolge anche *ELKF* ed, ancora, il simile *AP-1*. Legano siti di DNA in prossimità tra loro, complessandosi e modulandosi a vicenda (39, 40). La sua attività trascrizionale è depressa dagli estrogeni (41). *NF-E2* è un eterodimero con domini *L.Z.*, composto di una unità specifica dell'emopoiesi, la p45, e di una più ampiamente rappresentata, la p18.

Il fattore *GATA-1* è espresso anche in mast-zellen, in precursori emopoietici multipotenti, in eosinofili, basofili, cellule staminali e in eritroleucemie (42). È molto importante per lo sviluppo megacariocitario, come dimostrato dall'osservazione che in topi mancanti di una sua subunità non vengono prodotte piastrine e si ha morte per emorragia, senza grave compromissione della linea rossa. I megacariociti in questa situazione non presentano campeggiamento anche se proliferano in seguito a stimolo con trombopoietina (43). La sua possibile presenza in leucemie mieloidi acute è suggestiva di natura M6 o M7 (44).

Il *GATA-1* ed il *GATA-2* sono entrambi presenti in culture cellulari arricchite di precursori eritroidi e quando in esse si è indotta

differenziazione con l'eritropoietina il livello di *GATA-2* cala mentre quello di *GATA-1* continua ad essere espresso ad alto livello. La differenziazione eritroide è bloccata dall'espressione forzata del gene *GATA-2*. Quindi l'espressione del *GATA-1* è aumentata da un meccanismo autoregolatore in quanto dopo stimolazione con eritropoietina si nota ulteriore aumento del suo mRNA. La differenziazione cellulare indotta dal butirrato avviene invece non attraverso l'azione su enhancers ma per effetto diretto sui geni globinici (45).

La proteina *GATA-1*, il cui gene umano è stato clonato (46), è sovraespressa nella leucemia mieloide cronica giovanile con del(12p) o t(3;12), nella quale si notano anche abbondanti livelli di *EPOR* e HbF (47). È in grado di regolare l'espressione di un gene homeobox, l'*HOXB2*, presente particolarmente in precursori rossi e megacariocitari (48).

In cellule pluripotenti, in precursori precoci eritroidi e nel corso della maturazione rossa e megacariocitica è espressa la proteina *TAL-1/SCL*, il cui gene bersaglio non è noto (49). Essa è invece scarsamente rappresentata nei precursori monocitici e granulocitici e diminuisce ulteriormente nel corso della loro maturazione (50). Nel nucleo degli eritroblasti è presente anche una proteina, denominata *RBTN2*, che non è fosforilata ma complessata con la fosfoproteina *TAL-1*, con funzione non nota (51). Si conosce però che l'assenza di *RBTN2* nel topo porta a morte intrauterina per grave carenza dell'emopoiesi (52).

Mutazioni dei geni per *SCF* (stem cell factor) o per *C-KIT* (il suo recettore) causano grave anemia macrocitica (53).

Esistono varie interrelazioni tra *TAL-1* e *GATA*. Un promoter umano di *TAL-1* può essere transattivato da *GATA-1* e così in diverse cellule emopoietiche si riscontra co-espressione e sinergismo di *GATA-1* (e/o *GATA-2*) con *TAL-1*. Pertanto si può ipotizzare che la restrizione della trascrizione di *TAL-1* sia mediata da promoters in grado di attivarsi solo in questa linea e nella megacariocitica, nell'ambito di una coordinazione globale dei fattori di trascrizione (54).

L'anemia dei disordini cronici, della carenza di ferro e nell'intossicazione da piombo può essere collegata a blocco di siti di legame per *NF-E2*, che attiva la maggior parte di enhancer e promoter di geni specifici eritroidi. L'impedimento sarebbe mediato da metalloporfirine diverse dall'emina, quali le zinco porfirine, trovate appunto in quantità eccessiva nella flogosi cronica e nelle altre predette condizioni. La normale sintesi di emina induce trascrizione dei geni globinici mentre una sua riduzione si accompagna a diminuzione di *NF-E2* (55, 56).

L'*EKLF* (erythroid Krüppel-like factor) è ugualmente un fattore di trascrizione contenente motivi *Z.F.*, specifico eritroide, che attiva la tra-

scrizione di catene globiniche β legandosi a sequenze CACCC e CCACACCCT del relativo promoter. Il suo dominio legante il DNA è simile a quello dei fattori della famiglia Krüppel e a quello del fattore ubiquitario *PU.1*, soprattutto per quanto riguarda la capacità di legare sequenze CACC, il cui danno a livello dei promoter per le catene beta globiniche si accompagna a talassemia (57). Anomalie indotte nel gene *ELKF* del topo sono causa di morte intrauterina per difettosa eritropoiesi epatica (58). Domini leganti la stessa sequenza sono spesso presenti in elementi *GATA* e in molti altri fattori regolatori, quali promoter di geni per il recettore dell'eritropoietina, glicoforine, porfobilinogeno-deaminasi, piruvato-chinasi, catene alfa e beta. Interazioni funzionali tra *PU.1* e *GATA-1* avvengono dopo contatto fisico delle rispettive porzioni leganti il DNA (59).

La differenziazione eritroide esercitata da antracicline è mediata da *GATA-1* e *NF-E2* (60).

IL SINGOLARE COMPORTAMENTO DEL FATTORE IX NELL'EMOFILIA LEYDEN

Il cromosoma X, sede del gene per *GATA-1*, va incontro ad inattivazione parziale nel corso dello sviluppo parallelamente a metilazione, che sembra necessaria per mantenerlo silente (61). In esso sono situati anche il gene per il fattore IX della coagulazione. La varietà Leyden dell'emofilia B, dovuta a carenza del fattore predetto, è una malattia emorragica associata con mutazioni puntiformi nella regione promoter per il gene del IX (62). È correlata a bassi livelli infantili di fattore IX che cresce gradualmente con la pubertà, ritornando alla fine a valori normali. In questa fase dello sviluppo viene indotto il fattore di trascrizione epatico *DBP* (D-site binding protein) che interagisce con *C-EBP* (enhancer binding protein) nel legare enhancer del gene per il fattore IX (63).

FATTORI NF-KB E L'ORGANIZZAZIONE DELLE DIFESE

Geni e fattori importanti: NF-KB, C-JUN, C-FOS, NF-IL6, APRF, EGR1, PU.1, MB1, B-LYF, EBF, EBB1, BSAP, FL1, ERP, IKAROS, OCT1, OCT2, CBF.

La famiglia di fattori di trascrizione *NF-KB/REL* (una varietà di fattori nucleari), formata da complessi dimerici in diverse combinazioni, è costituita da proteine inducibili leganti elementi enhancer soprat-

tutto in linfociti. Si trovano originariamente nel citoplasma in forma inattiva, complessati con la proteina inibitrice *IκB*. Il contatto della cellula con citochine, virus, batteri, mitogeni, prostaglandine, leucotrieni, fattori di crescita ed altre sostanze chimiche promuove la dissociazione del complesso attraverso la fosforilazione e degradazione di *IκB* (64) e permette la traslocazione del fattore nel nucleo, dove si lega al DNA ed induce rapidamente attività coordinata di diversi geni preposti principalmente alle difese e alla flogosi, ma anche al controllo della crescita cellulare. Legano prevalentemente enhancers e promoters di geni per recettori di citochine, l'enhancer per le catene κ nei linfociti B e nei T anche enhancer di geni per la sintesi di virioni, compreso l'HIV (65).

I fattori di trascrizione *NF-KB* hanno ruoli diversificati in quanto nel corso dell'evoluzione i vari polipeptidi, assemblati in omeo- o eterodimeri, si sono progressivamente differenziati. Anche nel corso dello sviluppo corporeo si assiste a mutazione della composizione delle sue sottounità (66). Sono in grado di modulare l'espressione genica anche in situazioni che richiedono rapida risposta.

Una proteina della famiglia *NF-KB* subisce rapida fosforilazione tirosinica nei neutrofili dopo contatto con G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) e media il «burst» respiratorio, l'aumento del killing batterico e della sopravvivenza. Un'altra, in cooperazione con *AP-1*, media la rapida differenziazione macrofagica di cellule leucemiche indotta da esteri del forbolo (67). *AP-1*, che può unirsi in modo non-covalente con altri complessi trascrizionali, si lega a sequenze DNA eptameriche del tipo TGACTCA regolanti appunto la trascrizione di geni responsivi a fattori di crescita e a esteri del forbolo.

I fattori *NF-KB/REL* assieme ad altri presiedono alla risposta umorale B e cellulare T e alla proliferazione di queste cellule. La loro importanza nella crescita cellulare è dimostrata dalla disregolazione descritta in alcuni tipi di tumore. In particolare il *V-REL* è responsabile della leucemia aviaria mentre la sovraespressione del *C-REL* indotta in cellule coltivate dal trattamento con oligonucleotide antisense anti-*IκB* causa trasformazione neoplastica in cellule coltivate (68), a dimostrazione di una possibile attività antitumorale della proteina complessante *IκB* (69). Non sorprende quindi che mutazioni di *NF-KB* siano state implicate nella patogenesi di linfomi (70, 71, 72). La loro estremità 5'-terminale avrebbe però un ruolo nell'induzione di apoptosi in cellule midollari coltivate in vitro (73).

Aumentata attività nucleare di *NF-KB*, oltre che di *OCT-2* (vedi in seguito), è stata dimostrata in cellule di linfoma di Hodgkin coltivate (74). Anche in linfomi diffusi a grandi cellule è presente elevata fre-

quenza di amplificazione dello stesso gene, situato in 2p13-15, fino a 35 volte. La proteina codificata a sua volta induce amplificazione del gene per *TGF α* e per altre citochine della flogosi, quali Il-1, che a loro volta inducono sintesi di *NF-KB* (75). In corso di linfomi l'espressione della proteina risulta amplificata nel 23% dei casi senza evidenza di riarrangiamenti genici o traslocazioni a carico del cromosoma 2, mentre si nota associazione significativa con la delezione di 6q, con la trisomia 7, monosomia 17 o delezione di 17p.

Tra i geni attivati da *NF-KB* importanti sono quelli per immunorecettori e per molecole di adesione (*Elam-1*, *Vcam-1*, *Icam-1*), coinvolti non solo in eventi flogistici ma anche nel dare inizio alla lesione aterosclerotica (76).

La risposta flogistica dell'organismo vede spesso cooperazione tra il fattore di trascrizione in questione e *NF-M/NF-IL6/C-EBP β* , come nel caso dell'induzione di Il-8, al cui enhancer si legano entrambi i fattori (77). Quest'ultima citochina è prodotta da varie cellule, tra cui linfociti T, e partecipa attivamente alla flogosi come fattore chemotattico per granulociti e linfociti. Nel caso dei linfociti T il suo gene è attivato da *NF-KB* in seguito a stimolazione dei CD28 o CD3 di superficie; il sinergismo è bloccato dalla ciclosporina (78). Il ruolo principale di *NF-M* consiste però nell'attivazione trascrizionale del gene per Il-6, esercitata assieme a *NF-KB*. Il primo dei due fattori è inducibile da Il-1, *TNF α* , LPS e lega una sequenza di 14 paia di basi a -150 da esso. Attiva anche geni per altre citochine infiammatorie, per *C-FOS*, albumine e proteine della fase acuta (79, 80). Il-6 attiva rapidamente un fattore di trascrizione citoplasmatico, l'*APRF* (acute phase response factor) attraverso fosforilazione tirosinica (81). La sua esagerata espressione è osservata nel corso di molte neoplasie in rapporto a mutazioni di *p53*, che normalmente la reprime (82).

Alcune classi di farmaci attivi nell'immunità e nella flogosi come gli steroidi, i retinoidi, la ciclosporina e FK506 interferiscono con i *NF* e bloccano nei linfociti la via di trasduzione del segnale attivata dal legame del T-cell receptor con l'antigene, inibendo un suo costituente fondamentale, la calcineurina. La ciclosporina e l'FK506 inibiscono la produzione di Il-2 in linfociti T a livello di trascrizione genica. L'azione immunosoppressiva è esercitata da fattori transattivanti (83, 84, 85). Oltre a bloccare il sinergismo tra *NF-M* e *NF-KB*, attivano anche un fattore sensibile, il *NFATp*, che collabora con elementi della famiglia *FOS* e *JUN* nel regolare in senso negativo la trascrizione del gene per l'Il-2 (86) e bloccano nei linfociti la via di trasmissione del segnale attivata dal legame del T-CELL receptor con l'antigene inibendo un suo costituente fondamentale, la calcinevrina. Nel promoter del suo gene

esistono siti di legame per *SP1* e *EGR-1* (87). L'FK506 causa depressione di *NF-KB* dopo legami di antigeni con recettori superficiali di linfociti sia B che T (88).

Sono state recentemente chiarite la struttura tridimensionale di alcuni *NF*, il tipo di legame contratto con l'elica di DNA, ed alcune vie biochimiche attivate dall'interazione. Queste osservazioni potrebbero rappresentare il presupposto razionale allo sviluppo di farmaci che agiscano in maniera tessuto - o malattia - specifica, che siano rivolti verso particolari bersagli con definita importanza patogenetica e forniscano pertanto il massimo di efficacia con il minimo di effetti collaterali (89, 90).

Alla regolazione delle difese e della flogosi partecipano anche altri fattori di trascrizione ed oncogeni. Il gene 1 della risposta precoce di crescita (*EGR-1*), è indotto da segnali mitogenici e differenziativi in diversi tipi cellulari (91). In linee cellulari mieloidi il TNF causa sua transitoria espressione (92), che sembra indispensabile anche per la differenziazione macrofagica (93). In linfociti B è rapidamente espresso dopo contatto con antigeni (94).

Alla differenziazione precoce T e B partecipa anche una proteina prodotta dal locus *TCL1* del cromosoma 14q32.1 che in queste cellule risulta preferenzialmente espressa.

L'Il-4, una citochina importante per la crescita di T e B linfociti, di mast-zellen e per la produzione di IgE da parte di linfociti B, è prodotta dagli stessi T-linfociti e da cellule della linea basofila/mast-zellen ed ha quindi attività autocrina. Compreso nel primo introne del suo gene esiste un enhancer al quale si legano fattori attivanti del tipo *PU.1*, *GATA-1*, *GATA-2*, in modo differenziato nei linfociti e nelle mast-zellen (95). La citochina promuove la produzione di un importante fattore di trascrizione regolante le sottopopolazioni T, lo *Il-4-STAT* (96).

La destinazione di progenitori linfatici alla linea B o T avviene in stadi maturativi nei quali vari fattori di trascrizione attivano diversi geni specifici delle due linee. Il primo stadio della differenziazione B, il pro-B, non presenta riarrangiamenti dei geni immunoglobulinici bensì espressione di alcuni geni B-specifici quali B220 (isoforma del CD45), che permane fino alla maturazione in plasmacellula, il CD19, l' MB-1, proteina che esercita la sua funzione nel corso della stimolazione antigenica (97), il cui gene è sito in 19q13 (98). Tutti gli isotipi di immunoglobuline presenti sulla superficie di linfociti B sono associati con un complesso eterodimerico trans-membrana costituito appunto da MB-1 (CD79a) e B29 (CD79b) ed assieme costituiscono il complesso recettoriale dei B-linfociti (BCR).

L'assegnazione di linfociti immaturi alla filiera B è caratterizzata

precocemente dall'espressione del gene B29 in cellule pro-B, che inizia prima del riarrangiamento dei geni per catene pesanti e si protrae fino alla plasmacellula (99). Il promoter di questo gene, sito in 17q23, privo di TATA, contiene una sequenza ottamerica identica a quella presente nei promoters per catene immunoglobuliche pesanti e leggere, che può essere legata da proteine *ETS*, prodotte dagli omonimi oncogeni, quali *PU-1*, e da *IKAROS/LYF1*.

Un'altra proteina legante il DNA in fasi B precoci è il *BSAP* (B-cell specific activator protein), presente in tutta la linea B fatta eccezione per la plasmacellula (100). *BSAP* è codificata dal gene *PAX-5*, membro di una famiglia originariamente identificata nella *Drosophila* ma importante anche nello sviluppo di mammiferi. Tra i suoi bersagli vi è anche il promoter del gene per *CD19*, situato verosimilmente sul cromosoma 11 (101), considerato che topi con *PAX-5* mutante non presentano il CD19 sui linfociti B, il cui sviluppo è bloccato allo stadio di pro-B. La mancata espressione di CD19 su plasmacellule mielomatose, diversamente dalle normali, è stata messa in rapporto a diminuita attività di *PAX-5*, forse depressa da eterodimeri costituiti da prodotti di *EA2* ed *ID* (102).

Recentemente è stato dimostrato un feed-back negativo tra *BSAP* e *HXR-1*, fattore di trascrizione ubiquitario importante per lo sviluppo corporeo, del quale si riscontrano elevati livelli di mRNA quando il *BSAP* risulti soppresso (103).

Nella maggior parte dei geni specifici della linea B sono stati dimostrati siti del DNA leganti membri della famiglia *ETS*, ma nessuno di essi è espresso esclusivamente in queste cellule: infatti l' *ETS-1* è presente in cellule B e T, il *PU-1* e il *SP1-B* in tutte le cellule emopoietiche con l'eccezione dei linfociti T, i fattori *FLI-1* e *ERP* e *ERG-3* nei linfociti B ma anche in altri elementi (104). La proteina *PU.1* può legarsi con *CBF* (core binding factor, fattore attivo nel controllo della funzione linfocitaria) e *p53* (fattore inibente il ciclo cellulare) esercitando importanti influssi regolatori su enhancers immunoglobulinici, come se i fattori avessero funzioni di «master switch» nello sviluppo delle cellule emopoietiche in senso B-linfocitario (105, 106).

Come è noto le proteine *ETS* diventano attive come fattori di trascrizione dopo interazione con altre, quali *E12* e *NF-EM5*, importanti nella regolazione della sintesi di catene leggere.

Nei progenitori B precoci sono espressi anche membri dei geni homeobox, quali il già citato *OCT-2* che ha un omeodomain *POU* (vedi in seguito) legante la sequenza ottamerica ATGCAAAT, presente in tutti i promoters e nella maggior parte degli enhancers Ig. È ritenuto

importante regolatore dell'espressione di geni immunoglobulinici, anche se attualmente non è considerato essenziale per lo sviluppo B ma piuttosto per la differenziazione terminale, in quanto topi carenti del gene presentano normale numero di cellule ma grave difetto della secrezione immunoglobulinica e muoiono precocemente per cause non note. Influenza direttamente il gene codificante per la glicoproteina di superficie CD36 (107).

L'espressione precoce dei geni immunoglobulinici può dipendere anche dall'omeodominio *POU* di *OCT-1* che in linfociti B lega il DNA con specificità simile a *OCT-2*, interagendo però con il cofattore *OBF-1*, privo di capacità attivante autonoma, formando un complesso ternario con il DNA (108). *OCT2-A*, proteina specifica di B-linfociti, esercita importante ruolo nella espressione del gene HLA-DR (109).

Anche proteine del tipo *bHLH* regolano l'espressione genica di progenitori B legando sequenze tipo CANNTG in zone enhancers di molti geni specifici B. *L'E2A* ad esempio si lega con siti favorevoli la trascrizione del gene per le catene leggere κ solo in cellule B, sebbene sia presente ubiquitariamente, per ragioni non conosciute (110). La sua abolizione nel topo si accompagna a mancato sviluppo dei linfociti B (111).

L'importanza del fattore di trascrizione *PU.1* nella sintesi anticorpale è stata dimostrata anche in studi nella agammaglobulinemia X-linked, dovuta ad un difetto in Xq22 e più precisamente in un gene codificante una nuova tirosino-chinasi (di Bruton), omologa alle tirosina-chinasi della famiglia *scr*, ristretta al tessuto emopoietico. In pazienti con agammaglobulinemia X-linked sono stati descritti molti tipi di mutazione nella regione codificante per la tirosino-chinasi di Bruton ed in alcuni casi bassi livelli di mRNA, legati a mutazione del promoter in zone leganti il predetto fattore di trascrizione (112).

L'appartenenza di linfociti immaturi alla linea T è dimostrabile prima della condizione di timocita negativo per CD3, CD4 e CD8 e prima del riarrangiamento dei geni per il T cell receptor. Gli elementi T più precoci sono però CD44+, CD25- e positivi per il recettore C-Kit/SCF. Stadi successivi sono definiti da: CD44+, CD25+, C-Kit+; CD44, CD25+ e C-Kit-; e CD44-, CD25- e C-Kit-. Il riarrangiamento dei geni per il recettore T è dimostrabile dalla fase CD44-, CD25+ e C-Kit-. Il CD25 è presente sulla superficie di cellule T attivate e la sua presenza su timociti triplo-negativi è dovuta all'espressione dei fattori di trascrizione *NF-KB* e *AP-1* (113).

Timociti precoci sono già in grado di secernere Il-2, il cui gene è regolato, come già visto, in maniera critica dal fattore *NF-AT*, espresso in maniera transitoria nei timociti triplo-negativi per attivazione da parte

di fattori timici stromali e successivamente in elementi T maturi attivati. L'espressione precoce di *NF-AT*, costituito da *NF-ATp* e *AP-1*, è probabilmente importante per lo sviluppo T (114). *NF-ATp* è presente nel citoplasma e migra nel nucleo dopo attivazione cellulare unendosi ad *AP-1* e legandosi al promoter di *Il-2*, legato e attivato anche da un altro fattore, l' *NF-ATc* (115). La produzione di *NF-AT* declina sensibilmente con l'età (116).

Il fattore *REL-B* della famiglia *NF-KB* ha importanza nell'attivazione dei geni che sovrintendono alla maturazione timica di cellule dendritiche ed epiteliali midollari (117).

Nell'enhancer del gene per *CD3d* esiste una sequenza particolare, chiamata *box G*, ristretta alle cellule T, che reagisce con il fattore zinc finger *IKAROS/LYF1*, al quale, come si è visto, spetta un ruolo importante nella determinazione della linea linfocitaria. Topi con carenza omozigote di questo gene non producono linfociti T, B e NK e muoiono precocemente di infezione (118), mentre la carenza eterozigote è caratterizzata dall'insorgenza di linfomi. Il fattore di trascrizione *LYF1* deriva da un mRNA di *IKAROS* che è andato incontro a splicing alternativo (119). L'espressione dei geni per i recettori *TR α* e *TR δ* e del *CD8* è controllata anche da *GATA-3*, presente nei linfociti T ma non nei B, in epoca successiva all' *IKAROS* (120).

Vicino ad enhancer del gene per il *TR β* , esiste un motivo ricco di T/G, chiamato «sito core». Ad esso si lega una proteina chiamata *CBF* (core binding factor o *PEBP2*) assieme ad *ETS-1*. Il *CBF* è un complesso formato di almeno due proteine, delle quali la prima, il *CBF α* , è probabilmente identica a *AML-1*. Il suo ruolo non è ben chiaro (121).

Tab. II - Principali fattori di trascrizione, i domini leganti ed i bersagli coinvolti nella differenziazione linfocitaria

| PROTEINA | DOMINIO LEGANTE | BERSAGLIO |
|---------------|-----------------|---|
| Ikaros | zinc finger | TdT, enhancer di <i>CD3δ</i> |
| Pax-5 | paired | <i>CD19</i> , enhancer di <i>Igα</i> |
| EBF | EBF | <i>TCRα</i> , <i>TCRβ</i> , <i>TCRγ</i> , <i>TCRδ</i> |
| CBF | Homeodomain | <i>TCRα</i> , <i>TCRβ</i> , <i>TCRγ</i> , <i>TCRδ</i> , |
| <i>GATA-3</i> | zinc finger | <i>TCRα</i> , <i>TCRβ</i> , <i>TCRγ</i> , <i>TCRδ</i> . <i>CD3</i> |
| <i>ETS-1</i> | ets | enhancer di <i>Igα</i> e <i>Igm</i> , <i>MB-1</i> , <i>TCRα</i> , <i>TCRβ</i> |
| <i>PU.1</i> | ets | enhancer di <i>Ig</i> e <i>MB-1</i> |
| <i>E2A</i> | bHLH | enhancer <i>Ig</i> |
| <i>NF-AT</i> | Rel-corr. | <i>Il-2</i> , <i>Il-4</i> |

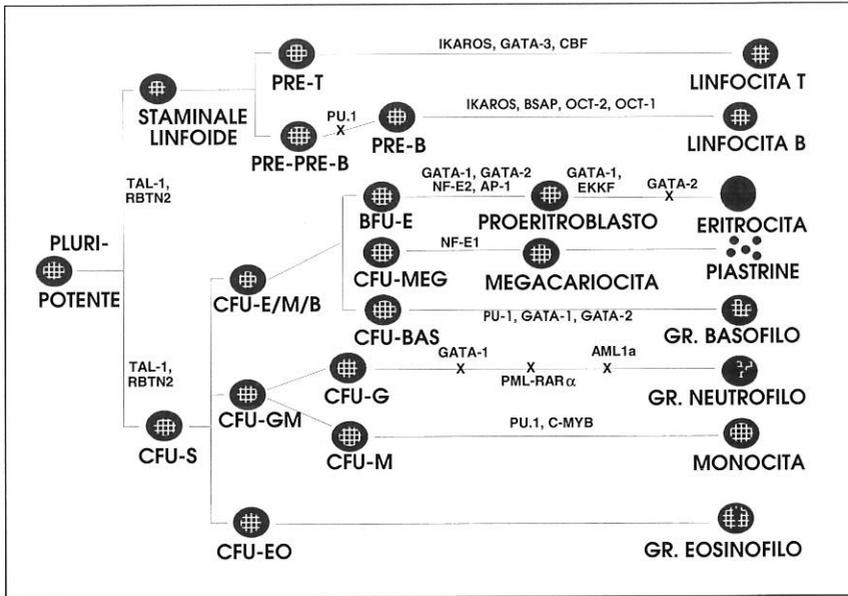


Fig. 6 - È schematizzata la differenziazione emopoietica midollare e l'azione promotrice o inibitrice di alcune proteine controllanti la trascrizione. Il segno X indica inibizione.

FATTORI DI TRASCRIZIONE E INFLUSSI AMBIENTALI

L'attivazione di fattori di trascrizione è sicuramente in rapporto anche con fattori ambientali. Ad esempio è noto che certe alterazioni metaboliche si accompagnano ad espressione di determinati fattori di trascrizione. Così la respirazione di ossigeno porta alla formazione di radicali reattivi pericolosi, in grado di danneggiare lipidi, proteine ed acidi nucleici. Si sono evoluti meccanismi protettivi verso elevati livelli di radicali intracellulari, quali attivazione di fattori di trascrizione (122), proteine di replicazione, proteasi, inibitori di proteasi, proteine che agiscono sulla proliferazione cellulare e vari antiossidanti, come eme-ossigenasi (123). Le radiazioni ionizzanti ed i perossidi, ad esempio, aumentano il fattore *EGR-1* (124).

La bassa tensione di ossigeno presente, tra l'altro, in neoplasie e processi fibrotici induce la trascrizione di molti geni. Le proteine sintetizzate, tra le quali è da citare l'eritropoietina, rendono capaci le cellule di sopravvivere in ambiente ipossico. Le regioni regolatrici responsabili dell'induzione della trascrizione del gene dell'EPO sono sequenze DNA cis-acting situate 5' e 3' rispetto al gene per l'EPO. Altre proteine

indotte dall'ipossia comprendono citochine (*PDGFβ* o fattore di crescita piastrinico beta, endotelina-1, *TGFβ* o fattore di crescita trasformante beta), enzimi e proteine dello stress (125). L'ambiente ipossico presente nella vita intrauterina mantiene scarsa espressione del fattore di trascrizione *ELKF*, promuovente la trascrizione di catene emoglobiniche β (126).

La trascrizione di geni in cellule endoteliali è controllata anche da caratteristiche fisiche del circolo. L'applicazione ad esse, anche in cultura, di elevato shear-stress (=velocità di slaminamento) influenza l'espressione di vari geni, come dimostrato da variazioni di differenti mRNA. Ad esempio shear stress fisiologici aumentano il *PDGFβ* (127).

Alterazioni del redox sono causa, almeno in vitro, di ritardata maturazione mieloide e scarsa induzione dei geni *AP-1* e *EGR-1* (128).

I GENI HOMEBOX

I geni omeotici contengono sequenze ripetitive di 183 basi codificanti porzioni polipeptidiche di 61 aminoacidi chiamate homeobox o homeodomain. La denominazione prende origine dal termine «omeotico» con il quale sono stati designati alcuni loci del genoma della *Drosophila* che presiedono alla formazione di segmenti corporei identici. Oggetto di lunghi ed ormai classici studi di genetica sono state alcune mutazioni a carico di queste sequenze nel moscerino della frutta, manifestantesi come sostituzione di un segmento del corpo in un altro. Un esempio è la condizione nella quale si osservano strutture di arti al posto delle antenne, nella quale risulta mutato un gene omeotico del complesso chiamato Ant-C.

L'homeodomain è un dominio legante il DNA capace di riconoscere determinate sequenze attraverso strutture del tipo «Helix-turn-helix». Questo motivo è costituito da due eliche alfa con angolo di 120° tra loro: La seconda delle eliche entra nell'incavo maggiore dell'elica del DNA e lega strutture specifiche (129). Abitualmente esiste una terza elica alla quale spetta la funzione di stabilizzazione del fattore di trascrizione (130).

È altamente conservato nella scala zoologica, dai nematodi, alla rana, al topo e all'uomo (131). La funzione dei geni homeobox è straordinariamente importante perchè ad essi si attribuisce un ruolo di geni master, controllori cioè del piano di sviluppo corporeo, anche nei mammiferi. Il loro pattern di espressione correla strettamente con specifiche strutture morfologiche nello sviluppo del telencefalo, del midollo spinale,

del tronco e di altre, come risulta evidente nel caso di delezioni omozigoti in topi transgenici (132).

Circa 40 homeobox di mammiferi sono stati designati di classe 1 per l'evidente somiglianza con il gene *Antennapedia* della *Drosophila*.

Nell'uomo esistono 38 geni homeobox organizzati in 4 clusters (A, B, C e D) localizzati nei cromosomi 2, 7, 12 e 17, la cui funzione è in buona parte ancora sconosciuta. Le proteine corrispondenti agiscono sia come attivatori trascrizionali che come inibitori.

Alcuni di questi geni non di classe 1 codificano per fattori di trascrizione con funzioni cellulose-specifiche, come ad esempio il fattore pituitario *PIT-1*, che regola l'espressione dell'ormone della crescita legandosi a elementi regolatori del gene relativo, il fattore epatico *LF-B1*, e il già citato fattore ottamerico legante geni Ig *OCT-2* (133, 134). Strutture di tipo homeobox sono infatti talvolta situate in vicinanza di altre sequenze configurando fattori di trascrizione costituiti da un motivo legante il DNA (l'homeodomain) combinato con un altro. È il caso dei fattori di trascrizione *POU* caratterizzati dalla presenza dell'omonimo dominio, costituito da una regione *POU*-specifico di 75 aminoacidi posta vicino ad una regione *POU*-homeodomain, simile ma non identica agli altri homeodomain, unite da un tratto di 15-27 aminoacidi. Il *PIT-1* e, come l' *OCT-2*, contiene una seconda regione legante il DNA, appunto un dominio *POU*-specifico (135).

Ai *POU* appartengono dunque i fattori di trascrizione leganti ottameri di DNA *OCT1* ed *OCT2*, il primo dei quali è ubiquitario, mentre il secondo è specifico del tessuto linfatico in quanto si unisce a strutture enhancer di geni immunoglobulinici. In *OCT1* la struttura homeodomain è organizzata in tre regioni elicoidali e la regione *POU*-specifico in quattro alfa eliche (136) (fig. 7).

Il legame tra DNA e fattori di trascrizione *OCT* richiede il dominio *POU*-specifico oltre a quello *POU*-homeodomain. Il primo, richiesto per il legame di strutture ottameriche (137), è importante soprattutto per la specificità attraverso il diretto contatto con il DNA.

Il dominio *POU*-specifico è un motivo conservato nell'evoluzione, presente in tutta l'omonima famiglia di fattori di trascrizione, coinvolta in generale nel controllo dello sviluppo, come nel caso di *OCT-3*, 4 e 6.

Geni homeobox del tipo *HOXA*, *HOXB* e *HOXC* sono espressi in cellule emopoietiche in modo linea-specifico. In particolare *HOXA10*, di cui si è parlato a proposito della mielopoiesi, *HOXA11* e *HOXA13* sono ristretti alla linea granuloblastica mentre la maggior parte di quelli codificati dal cluster *HOXB* sono di pertinenza eritroblastica e gli *HOXC* di cellule linfatiche (138, 139, 140). Così *HOXB4* è espresso in

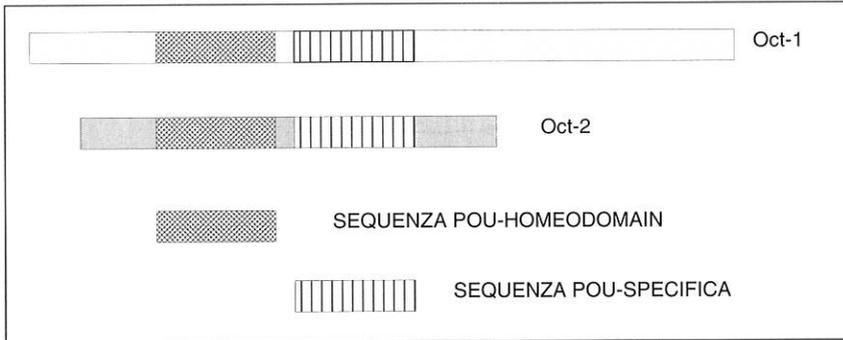


Fig. 7 - I fattori di trascrizione POU, quali gli Oct (leganti ottameri di DNA) sono costituiti da un dominio simil-homeodomain (POU-HD) e da un dominio POU-specifico (POU-S). La prima componente ha maggiore capacità di legame con il DNA, la seconda è importante per la specificità della trascrizione.

cellule del mesoderma, del fegato fetale e nelle emopoietiche CD34+, nelle quali incrementa l'attività proliferativa ripopolante il midollo. In cultura la sua sovraespressione aumenta il numero di colonie miste, ma soprattutto eritroidi, senza interferire su *GATA-1* (141).

Il gene *HOX11*, ancora «orfano» in quanto non catalogato in nessun gruppo *HOX*, sovrintende nel topo alla formazione della milza, o, più precisamente, al blocco dell'apoptosi delle cellule spleniche nel corso dell'ontogenesi (142, 143).

GLI ONCOGENI JUN E FOS

Tra i proto-oncogeni con proprietà di fattori di trascrizione i *C-JUN*, *B-JUN*, *D-JUN* e *C-FOS*, dotati di uno zipper leucinic che media la dimerizzazione, codificano per fattori che partecipano alla regolazione della crescita e differenziazione cellulare. La trascrizione di *C-JUN* può essere indotta in maniera rapida come risposta a stimoli sierici o di fattori di crescita.

Come già visto, il prodotto dei due proto-oncogeni nucleari *C-JUN* e *C-FOS* tende a unirsi formando l'eterodimero *AP-1* (activator protein 1), che a sua volta può unirsi in modo non-covalente con altri complessi trascrizionali. L'*AP-1* si lega a sequenze DNA eptameriche del tipo TGACTCA che regolano la trascrizione di geni responsivi a fattori di crescita e a esteri del forbolo. Le stesse sequenze sono anche riconosciute da prodotti sia di *C-JUN* che di *V-JUN*.

Il dominio «L.Z.» del *C-FOS* è necessario per l'attività legante il DNA dell'eterodimero *AP-1*, mentre lo stesso dominio del *C-JUN* è essenziale per la formazione di eterodimeri. Il *C-JUN* dimerizza sia con se stesso che con *C-FOS*, quest'ultimo solo con *C-JUN*.

L'espressione dei diversi membri della famiglia Jun, di volta in volta attivatori o repressori della trascrizione, varia da un tessuto all'altro (144).

Alla nascita cellule emopoietiche di linearità mieloide esprimono alti livelli di *C-FOS*, ma non è ancora noto il ruolo di *AP-1* nella normale emopoiesi o nella leucemogenesi. Si è però visto che l'espressione forzata di *C-JUN* o *C-FOS* in cellule mieloblastiche leucemiche favorisce la differenziazione e diminuisce l'aggressività (145). In cellule mieloidi l'espressione di geni JUN è stimolata da chinasi proteiche c-AMP-dipendenti (146).

I lipopolisaccaridi causano nel macrofago attivazione dell'espressione dei geni per *C-JUN* e *C-FOS* e quindi sintesi di *AP-1*, mentre l'interferon gamma ed il TNF stimolano *C-FOS* ma scarsamente la produzione di *AP-1* (147). Il pretrattamento delle stesse cellule con Il-4 diminuisce l'espressione sia di *C-JUN* che di *C-FOS* (148). L'accumulo di mRNA per *C-JUN*, *B-JUN* e *C-FOS* nei macrofagi è stato confermato in esperimenti di induzione di differenziazione in due diversi cloni di cellule mieloidi con Il-6, GM-CSF o Il-3. (149).

È stato osservato che varie linee neoplastiche presentano elevati livelli di *C-JUN*, come se questi potessero giocare un ruolo nella trasformazione tumorale. La sua espressione è regolata dal gene per il fattore di trascrizione *E1A*, regolatore della crescita e sviluppo cellulare (150).

Alcuni farmaci citostatici esercitano azione di stimolo su *C-JUN*, il cui significato rimane oscuro. L'ARA-C, ad esempio, induce differenziazione terminale di cellule umane di leucemia mieloide attraverso aumento di mRNA per *C-JUN*, a sua volta regolato da meccanismo trascrizionale (151). L'espressione di *C-JUN* indotta da ARA-C è regolata dall'attivazione di una chinasi proteica C, che risulta aumentata dopo somministrazione del farmaco (152).

Anche l'etoposide induce espressione dello stesso proto-oncogene in cellule HL-60 (leucemia mieloide acuta), massima a 3 ore e transitoria, con meccanismo trascrizionale (153), come pure il trattamento con 8-bromoadenosina, 3', 5' AMP, attraverso stimolazione di chinasi proteiche C (154).

GENI E NEOPLASIE EMATOLOGICHE: GENERALITÀ

Come si è visto, a livello molecolare lo sviluppo emopoietico può essere definito con sufficiente precisione come cascata di segnali di trasduzione finemente regolata. Stimoli ambientali captati alla superficie cellulare da specifici recettori sono trasmessi dalla superficie al nucleo da messaggeri secondari, e nel nucleo agiscono da fattori di trascrizione attivanti o disattivanti in modo da guidare appropriatamente l'espressione genica. Difetti della regolazione dei predetti meccanismi sono alla base di molte degenerazioni neoplastiche di cellule ematologiche. È quindi evidente che tali aspetti siano attualmente oggetto di intensa ricerca e abbiano già dato interessanti risultati, come si vedrà in un seguente articolo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) KLUG A.: Gene regulatory proteins and their interaction with DNA. *Ann N Y ACA SCI* 1995; 758:143-160.
- (2) WECHSLER D.S., PAPOULAS O., DANG C.V. *et al.*: Differential binding of c-Myc and Max to nucleosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14:4097-107.
- (3) MURRE C., MCCAW P., BALTIMORE D.: A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding. daughterless, MyoD, and Myc proteins. *Cell* 1989; 56: 777-788.
- (4) MORRIS J., RAUSCHER F.J. III, DAVIS B. *et al.*: The myeloid zinc finger gene, MZF-1, regulates the CD34 promoter in vitro. *Blood* 1995; 86: 3640-3647.
- (5) NICHOLS J., NIMER S.D.: Trascrizione fattori, Translocazioni and Leukemia. *Blood* 1992; 80: 2953-2963.
- (6) CHRISTIANSON D.W.: Structural biology of zinc. *Adv. Protein. Chem.* 1991; 42: 281-355.
- (7) BERG J.: Zinc finger proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1993; 3: 11-16.
- (8) NAKAMURA K., TAKAHASHI T., SASAKI Y. *et al.*: 1,25-dihydroxyvitamin D3 differentiates normal neutrophilic promyelocytes to monocytes/macrophages in vitro. *Blood* 1996; 87: 2693-2701.
- (9) MANOLAGAS S.C., YU X.P., GIRASOLE G. *et al.*: Vitamin D and the hematolymphopoietic tissue: a 1994 update. *Semin Nephrol* 1994; 14: 129-143.
- (10) ZHANG D.E., HETINGHTON C.J., CHEN H.M. *et al.*: The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol* 1994;14:373-381.
- (11) ROSS I.L., DUNN T.L., YUE X. *et al.*: Comparison of the expression and function of the transcription factor PU.1 (SPI-1 proto oncogene) between murine macrophage and B lymphocytes. *Oncogene* 1994; 9: 121-132.
- (12) SCOTT E.W., SIMON M.C., ANASTASI J. *et al.*: Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 1994; 265: 1573-1577.

- (13) HROMAS R., ORAZI A., NEIMAN R.S. *et al.*: Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* 1993;82:2998-3004.
- (14) VOSO M.T., BURN T.C., WULF G. *et al.*: Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 7932-7936.
- (15) CHEN H.M., PAHL H.L., SCHEIBE R.J. *et al.*: TI - The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity. *J Biol Chem* 1993; 268: 8230-8239.
- (16) BYRAS J.A., REENSTRA W.R., FENTON M.J.: NF beta A, a factor required for maximal interleukin-1 beta gene expression is identical to the ets family member PU.1. Evidence for structural alteration following LPS activation. *Mol Immunol* 1995; 32: 541-554.
- (17) MELOTTI P., CALABRETTA B.: Ets-2 and c-Myb act independently in regulating expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34. *J Biol Chem* 1994;269: 25303-25309.
- (18) INTRONA M., LUCHETTI M., CASTELLANO M. *et al.*: The myb oncogene family of transcription factors: potent regulators of hematopoietic cell proliferation and differentiation. *Semin. Cancer Biol.* 1994; 5: 113-24.
- (19) JACOBS S.M., GORSE K.M., KENNEDY S.J. *et al.*: Characterization of a rearrangement in the C-MYB promoter in the acute lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1994;75: 31-39.
- (20) TOTH F.D., KISS J., KISS A. *et al.*: Co-expression of c-abl and c-myb oncogenes in Philadelphia chromosome-negative, bcr-negative chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Res*: 1994; 18: 373-80.
- (21) WERNERT N., GILLES F., FAFEUR V. *et al.*: Stromal expression of C-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* 1994; 54: 5683-8.
- (22) REDDY M.A., YANG B.S., YUE X. *et al.*: Opposing actions of c-ets/PU.1 and c-myb protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) genes. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 2309-2319.
- (23) GOLAY J., LOFFARELLI L., LUPPI M. *et al.*: The human A-myb protein is a strong activator of transcription. *Oncogene* 1994 Sep; 9(9): 2469-2479.
- (24) NESS S.A., KOWENZ-LEUTZ E. *et al.*: Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev* 1993; 7: 749-759.
- (25) ALLEVA D.G., ASKEW D., BURGER C.J. *et al.*: Macrophage priming and activation during fibrosarcoma growth: expression of c-myb, c-myc, c-fos, and c-fms. *Immunol. Invest.* 1994; 23: 457-472.
- (26) NESS S.A., KOWENZ-LEUTZ E., CASINI T. *et al.*: Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev* 1993; 7: 749-759.
- (27) LOWNWY P., CORRAL J., DETMER K. *et al.*: A human HOX 1 homeobox gene exhibits myeloid-specific expression of alternative transcripts in human hematopoietic cells. *Nucleic Acid Res* 1991; 19: 3443-3449.
- (28) MORRIS J.F., HROMAS R., RAUSCHER F.J.: Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 1786-95.

- (29) HROMAS R., COLLINS S.J., HICKSTEIN D. *et al.*: A retinoic acid responsive human zinc finger gene, MZF1, preferentially expressed in myeloid cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 14183-14187.
- (30) WANG C.Y., BASSUK A.G., BOISE L.H. *et al.*: Activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 1153-1159.
- (31) BRIGGS R.C., BRIGGS J.A., OZER J. *et al.*: The human myeloid cell nuclear. Differentiation antigen gene is one of at least two related interferon-inducible genes located on chromosome 1q that are expressed specifically in hematopoietic cells. *Blood* 1994; 83: 2153-2162.
- (32) BRIGGS R., DWORIN L., BRIGGS J. *et al.*: TI - Interferon alpha selectively affects expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen in late stage cells in the monocytic but not the granulocytic lineage. *J Cell Biochem* 1994; 54: 198-206.
- (33) RAICH N., ROMEO P.H.: Erythroid regulatory elements. *Stem Cells* 1993; 11: 95-104.
- (34) FARINA S.F., GIRARD L.J., VANIN F. *et al.*: Dysregulated expression of GATA-1 following retrovirus-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cell increases erythropoiesis. *Blood* 1995; 86: 4124-4133.
- (35) CHIN K., ODA N., SHEN K. *et al.*: Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor. *Nucleic Acid Res* 1995;23:3041-3049.
- (36) MARTN D.I.K., TSAI S.F., ORKIN S.H.: Increased gamma-globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature* 1989; 338: 435.
- (37) MOI P., LOUDIANOS G., LAVINHA J. *et al.*: Delta thalassemia due to a mutation in an erythroid specific binding protein sequence 3' to the delta globin gene. *Blood* 1992; 79: 512-516.
- (38) STAMATOYANNOPOULOS J.A.: NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of Dnase I hypersensitive site of the human beta-globin locus control region. *Embo J.* 1995; 14: 106-116.
- (39) MERIKA M.: Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and ELKF. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2437-2447.
- (40) GREGORY R.C., TAXMAN D.J., SESHASAYEE D. *et al.*: Functional interaction of GATA-1 with erythroid Kruppel-like factor and SP1 at defined erythroid promoters. *Blood* 1996; 87: 1793-1801.
- (41) LOBEL G.A., SIEFF C.A., ORKIN S.H.: Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3147-3153.
- (42) GUERRASIO A., SAGLIO G., ROSSO C. *et al.*: The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res.* 1995; 55: 34-38.
- (43) SHIVDASANI R.A., ROSENBLATT M.F., ZUCKER-FRANKLIN D. *et al.*: Transcription factors NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF megakaryocyte development. *Cell* 1995;81:695-704.
- (44) EKERT H., SIEVERS E.L., TAN A. *et al.*: GATA-1 is expressed in acute erythroblastic leukaemia. *Br. J. Hematol.* 1994; 86: 410-412.

- (45) BUSFIELD S.J., SPADACCINI A., RICHES K.J. *et al.*: The major erythroid DNA-binding protein GATA-1 is stimulated by erythropoietin but not by chemical inducers of erythroid differentiation. *Eur J Biochem* 1995; 230: 475-480.
- (46) TRAINOR C.D., EVANS T., FELSENFELD G. *et al.*: Structure and evolution of a human erythroid transcription factor. *Nature* 1990; 343: 92-96.
- (47) PRIVITERA E., SCHIRO R., LONGONI D. *et al.*: Constitutive expression of GATA-1, EPOR, alpha globin, and gamma globin genes in myeloid clonogenic cells from juvenile chronic myelocytic leukemia. *Blood* 1995; 86: 323-328.
- (48) VIEILLE-GROSJEAN I., HUBER P.: Transcription factor GATA-1 regulates human HOXB2 gene expression in erythroid cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 4544-4550.
- (49) GREEN A.R., BEGLEY C.G.: SCL and related hemopoietic helix-loop-helix transcription factors. *Int. J. Cell. Cloning* 1992; 10: 269-276.
- (50) HOANG T., PARADIS E., BRADY G. *et al.*: Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 1996; 87: 102-111.
- (51) VALGE-AARCHER V.E., OSADA H., WARREN A.J. *et al.*: The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 8617-8821.
- (52) WARREN A.J., COOLEGE W.H., CARLTON M.B.L. *et al.*: The oncogenic cysteine rich LIM domain protein RBTN2 is essential for erythroid development. *Cell* 1994; 78: 45-57.
- (53) WEILWE S.R., MOU S., DEBERRY C.S. *et al.*: JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 1996; 87: 3688-3693.
- (54) BOCKAMP E.O., MCCLAUGHLIN F., MURRELL A.M. *et al.*: Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter. *Blood* 1995; 86: 1502-1514.
- (55) PALMA J.F., GAO X., LIN C.H. *et al.*: Iron protoporphyrin IX (hemin) but not tin or zinc protoporphyrin IX can stimulate gene expression in K562 cells from enhancer elements containing binding sites for NF-E2. *Blood* 1994; 84: 1288-1297.
- (56) MEGURO K., IGARASHI K., YAMAMOTO M. *et al.*: The role of the erythroid specific delta-aminolevulinate synthase gene expression in erythroid heme synthesis. *Blood* 1995; 86: 940-948.
- (57) FENG W.C., SOUTHWOOD C.M., BIEKER J.J.: Analyses of beta-thalassemia mutant DNA interactions with erythroid Kruppel-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 1493-1500.
- (58) NUEZ B., MICHALOVICH D., BYGRAVE A. *et al.*: Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 1995; 375: 316-318.
- (59) MERIKA M., ORKIN S.H.: Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell. Biol.* 1995; 15: 2437-2447.
- (60) TRENTESAUX C., NYOUNG M.N., ARIES A. *et al.*: Increased expression of GATA-1 and NF-E2 erythroid-specific transcription factors during aclacinomycin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Leukemia* 1993;7: 452-457.
- (61) RAZIN A., CEDAR H.: DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.* 1991; 55: 451-458.
- (62) REIJNEN M.J., PEERLINCK K., MAASDAM D. *et al.*: Hemophilia B Leyden: substitution of thymine for guanine at position -21 results in a disruption of a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor IX promoter. *Blood* 1993; 82: 151-158.

- (63) PICKETTS D.J., LILLICRAP D.P., MUELLER C.R.: Synergy between transcription factors DBP and C/EBP compensates for a haemophilia B Leyden factor IX mutation. *Nat. Genet.* 1993; 3: 175-179.
- (64) HENKEL T., MACLEIDT T., ALKALAY I. *et al.*: Rapid proteolysis of I κ B is necessary for activation of transcription factor NF-KB. *Science* 1993; 365: 182-185.
- (65) PERKINS N.D., EDWARDS N.L., DUCKETT C.S. *et al.*: A cooperative interaction between NF-KB and SP1 is required for HIV-1 enhancer activation. *Embo j* 1993; 12: 3551-3558.
- (66) GRUMONT R.J., GERONDAKIS S.: The subunit composition of NF-kappa B complexes changes during B-cell development. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 1321-1331.
- (67) ADLER V., KRASFT A.S.: Regulation of AP-1 enhancer activity during hematopoietic differentiation *J Cell Physiol* 1995; 164: 26-34.
- (68) KRALOVA J., SCHATZLE J.D., BARGMANN W. *et al.*: Transformation of avian fibroblast overexpressing the c-rel protooncogene and a variant of c-rel lacking 40 C-terminal amino acids. *J. Virol* 1994; 68: 2073-2083.
- (69) BEAUPARLANT P., KWAN I., BITAR R. *et al.*: Disruption of I kappa B alpha regulation by antisense RNA expression leads to malignant transformation. *Oncogene* 1994; 9: 3189-3197.
- (70) HOULDSWORTH J., MATHEW S., RAO P.H. *et al.*: Rel proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996; 87: 25-29.
- (71) SIEBENLIST U., FRANZOSO G., BROWN K.: Structure, regulation and function of NF.KB. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455.
- (72) GILMORE T.D.: Role of rel family genes in normal and malignant lymphoid cell growth. *Cancer Surv* 1992; 15: 69-87.
- (73) ABBADIE C., KABRUN N., BOUALI F. *et al.*: High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell* 1993;75:899-912.
- (74) BARGOU R.C., LENG C., KRAPPMANN D. *et al.*: High-level nuclear NF-KB and OCT-2 is a common feature of cultured hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 1996; 87: 4340-4347.
- (75) MESSNER G., WEISS E.H., BAUERLE P.A.: Tumor necrosis factor beta (TNF-b) induces binding of the NF-KB transcription factor to a high affinity KB element in the TNF-b promoter. *Cytokine* 1990; 2: 389-397.
- (76) COLLINS T.: Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.* 1993; 68: 499-508.
- (77) KUNSCH C., LANG R.K., ROSEN C.A. *et al.*: Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J. Immunol.* 1994; 153: 153-164.
- (78) WECHSLER A.S., GORDON M.C., DENDORFER U. *et al.*: Induction of IL-8 expression in T cells uses the CD28 costimulatory pathway. *J. Immunol.* 1994; 153: 2515-2523.
- (79) ISSHIKI H., AKIRA S., TANABE O. *et al.*: Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2757-2764.
- (80) MATSUSAKA T., FUJIKAWA K., NISHIO Y. *et al.*: Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10193-10197.

- (81) LUTTICKEN C., COFFER P., YUAN J. *et al.*: Interleukin-6 induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: evidence for a role in interleukin-6 target gene induction. *Febs lett.* 1995;360:137-143.
- (82) MARGULIES L., SEHGAL P.B.: Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP beta (NF-IL6) activity by p53 species. *J Bio. Chem.* 1993; 15: 15096-150100.
- (83) PARK J., YASEEN N.R. HOGAN P.G. *et al.*: Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 20653-9.
- (84) RAO A.: NFATp, a cyclosporin-sensitive transcription factor implicated in cytokine gene induction. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57: 536-42.
- (85) BANERJI S.S., PARSONS J.N., TOCCI M.J.: The immunosuppressant FK-506 specifically inhibits mitogen-induced activation of the interleukin-2 promoter and the isolated enhancer elements NFIL-2A and NF-AT1. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 11: 4074-4087.
- (86) JAIN J., BURGEON E., BADALIAN T.M. *et al.*: Similar DNA binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region *J Biol Chem* 1995; 270: 4138-4145.
- (87) SKERKA C., DECKER E.L., ZIPFEL P.F.: A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 1995;270:22500-22506.
- (88) VENKATARAMAN L., BURAKOFF S.J., SEN R.: FK506 inhibits antigen receptor-mediated induction of c-rel in B and T lymphoid cells. *J Exp Med* 1995; 81: 1091-1099.
- (89) BUSTIN S.A., MCKAY I.A.: Transcription factors: targets for new designer drugs. *Br. J. Biomed. Sci.* 1994; 51: 147-157.
- (90) LOMBARDI L., CIANA P., CAPPELLINI C. *et al.*: Structural and functional characterisation of the promoter regions of the NFkB2 gene. *Nucleic Acid Res* 1995; 23: 2328-2336.
- (91) NAGAI T., HARIGAE H., ISHIHARA H. *et al.*: Activation of early growth response 1 gene transcription and pp90rsk during induction of monocytic differentiation. *Cell Growth Differ.* 1994; 5: 259-265.
- (92) SALEEM A., Yuan Z.M., Taneja N. *et al.*: Activation of serine/threonine protein kinases and early growth response 1 gene expression by tumor necrosis factor in human myeloid leukemia cells. *J Immunol* 1995; 154: 4150-4156.
- (93) KHARBANDA S.: Actions of c-ets/PU.1 and c-myb protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) genes. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 2309-2319.
- (94) MCMAHON S.B., MONROE J.G.: A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of egr-1 through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15: 1086-1093.
- (95) HENKEL G., BROWN M.A.: PU.1 and GATA: components of a mast cell-specific interleukin 4 intronic enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 7737-7741.
- (96) HOU J., SCHINDLER U., HENZEL W.J. *et al.*: An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994; 265: 1701-1076.
- (97) ROLINK A. M., WELCHERS F.: Generation and regeneration of cells of the B-lymphocyte lineage. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 207-217.
- (98) HA H., BARNOSKI B.L., SUN L. *et al.*: Structure, chromosomal localization, and methylation pattern of the human mb-1 gene. *J Immunol* 1994; 152: 5749-5757.

- (99) THOMPSON A.A., WOOD W.J., GILLY M.J. *et al.*: The promoter and '5 flanking sequences controlling human B29 gene expression. *Blood* 1996; 87: 666-673.
- (100) BARBERIS A., WIDENHORN K., VITELLI L. *et al.*: A novel B-cell lineage specific transcription factor present at early but not late stage of differentiation. *Genes Dev.* 1990; 4: 849-859.
- (101) STAPLETON P., KOZMIK Z., WEITH A. *et al.*: The gene coding for the B cell surface protein CD19 is localized on human chromosome 16p11. *Hum Genet* 1995; 95: 223-225.
- (102) MAHMOUD M., HUANG N., NOBUYOSHI M. *et al.*: Altered expression of Pax-5 gene in human myeloma cells. *Blood* 1996; 87: 4311-4315.
- (103) REIMOLD A.M., PONATH P.D., LI Y.S. *et al.*: Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 393-401.
- (104) KEHRL J.H.: Hematopoietic lineage commitment: role of transcription factors. *Stem Cell* 1995; 13: 223-241.
- (105) HAJRA A., COLLINS F.S.: Structure of the leukemia-associated human CBF β gene. *Genomics* 1995; 26571-26579.
- (106) BORELLINI F., GLAZER R.I.: Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 7923-7928.
- (107) KONIG H., PFISTERER P., CORCORAN L.M. *et al.*: Identification of CD36 as the first gene dependent on the B-cell differentiation factor Oct-2. *Genes Dev.* 1995; 9: 1598-1607.
- (108) STRUBIN M., NEWELL J.W., MATTHIAS P.: OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding protein. *Cell.* 1995; 80: 497-506.
- (109) ABDULKADIR S.A., KRISHNA S., THANOS D. *et al.*: Functional roles of the transcription factor Oct-2A and the high mobility group protein I/Y in HLA-DRA gene expression. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 487-500.
- (110) HUNGER S.P.: Chromosome translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia. clinical features and molecular pathogenesis. *Blood* 1996; 87: 1211-1224.
- (111) SUN X. H.: Constitutive expression of Id1 gene impair the mouse B-cell development. *Cell.* 1994; 79: 893-900.
- (112) HIMMELMANN A., THEVENIN C., HARRISON K. *et al.*: Analysis of the Bruton's tyrosino kinase gene promoter reveals critical PU.1 and SP1 sites. *Blood* 1996;87:1036-1044.
- (113) ZUNIGA-PFLUCKER J.C., SCHWARTZ H.L., LENARDO M.L.: Gene transcription in differentiating immature T-cell receptor negative thymocytes resembles antigen activated mature T-cells. *J. Exp. Med.* 1993;178:1139-1149.
- (114) JAIN J., MCCAFFREY P.G., VALGE-ARCHER V.E. *et al.*: Nuclear factors of activated T-cells contain Fos and Jun. *Nature* 1992;356:801-804.
- (115) NORTHROP J.P., HO S.N., CHEN L. *et al.*: NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cells activation. *Nature* 1994;369:497-502.
- (116) PAHLAVANI M.A., HARRIS M.D., RICHARDSON A.: The age-related decline in the induction of IL-2 transcription is correlated to changes in the transcription factor NFAT. *Cell. Immunol* 1995; 165: 84-91.
- (117) BURKLY L., HESSON C., OGATA L. *et al.*: Expression of RelB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 1995; 373: 531-536.

- (118) GEOGOPOULOS K., BIGBY M., WANG J.H. *et al.*: Thr Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994; 79: 143-156.
- (119) HAHM K., ERNST P., LO K. *et al.*: The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 7111-7123.
- (120) GEOGOPOULOS K., MOORE D.D., DERFER B.: Ikaros, an early lymphoid specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 1992; 258: 808-812.
- (121) KAGOSHIMA H., SHIGESADA K., SATAKE M. *et al.*: The runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trend Genet* 1993; 9: 338-341.
- (122) PAHL H. L., BAEUERLE P.A.: Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays* 1994; 16: 497-502.
- (123) JANSSEN Y.M., VAN HOUTEN B., BORM P.J. *et al.*: Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.* 1993; 69: 261-274.
- (124) DATTA R., TANEJA N., SUKHATME V.P. *et al.*: TI - Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993 Mar 15; 90(6): 2419-22.
- (125) BUETTNER R., KANNAN P., IMHOF A. *et al.*: An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 4174-4185.
- (126) DONZE D., TOWENS T.M., BIECKER J.J.: Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma to beta globin gene switching. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 1955-1959.
- (127) RESNICK N., COLLINS T., ATKINSON W. *et al.*: Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Aug 15; 90(16): 7908]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 4591-4595.
- (128) ESPOSITO F., AGOSTI V., MORRONE G. *et al.*: Inhibition of the differentiation of human myeloid cell lines by redox changes induced through glutathione depletion. *Biochem J* 1994; 301: 649-653.
- (129) HARRISON S.C.: A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 1991; 353: 715-719.
- (130) TRAVERS A.A., KLUG A.: Bending of DNA in nucleoprotein complexes. In: *DNA Topology and its Biological Effects*. N.R. Cozzarelli and J.C. Wang, Eds., 57-106, 1990, Cold Spring Harbor, N.Y.
- (131) CASTRONOVO V., KUSAKA M., CHARLOT A. *et al.*: Homeobox genes: potential candidates for the transcriptional control of the transformed and invasive phenotype. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 47: 137-143.
- (132) DESCHAMPS J., MEIJLINK F.: Mammalian homeobox genes in normal development and neoplasia. *Crit. Rev. Oncol.* 1992; 3: 117-73.
- (133) XIA Y.R., ANDERSEN B., MEHRABIAN M. *et al.*: Chromosomal organization of mammalian POU domain factors. *Genomics* 1993; 18: 126-30.
- (134) COCKERILL P.N., KLINKEN S.P.: Octamer-binding proteins in diverse hemopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10: 1293-1296.
- (135) VERRIJZER C.P., STRATING M., MUL Y.M. *et al.*: POU domain transcription factors from different subclasses stimulate adenovirus DNA replication. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6369-75.

- (136) VERRIJZER C.P., ALKEMA M.J., VAN WEPEREN W.W. *et al.*: The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains. *Embo J.* 1992;11:4993-5003.
- (137) Magli M.C., Barba P., Celetti A. *et al.*: Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 6348-6352.
- (138) MEAZZA R., FAIELLA A., CORSETTI M.T. *et al.*: Expression of HOXC4 homeoprotein in the nucleus of activated human lymphocytes. *Blood* 1995; 85: 2084-90.
- (139) VERRIJZER C.P., VAN OOSTERHOUT J.A.W., VAN WEPEREN W.W. *et al.*: POU proteins bend via the POU-specific domain. *Embo J* 1991; 10: 3007-3014.
- (140) BIJL J., VAN OOSTVEEN W., KREIKE M. *et al.*: Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* 1996; 87: 1737-1745.
- (141) HELGASON C.D., SAUVAGEAU G., LAWRENCE H.J. *et al.*: Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood* 1996; 87: 2740-2749.
- (142) ROBERTS C.W.M., SHUTTER J.R., KORSMEYER S.J. *et al.*: Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature* 1994; 368: 747.
- (143) DEAR T.N., COLLEDGE W.H., CARLTON M.B. *et al.*: The Hox11 gene is essential for cell survival during spleen development. *Development* 1995; 121: 2909-15.
- (144) KAMINSKA B, KACZMAREK L, MALAGUARNERA L. *et al.*: Transcription factor activation and functional stimulation of human monocytes. *Cell Biol. Int. Rep.* 1992; 16: 37-45.
- (145) DATTA R., NAKAMURA T., SHERMAN M.L. *et al.*: Regulation of jun-B expression by a cyclic AMP (cAMP)-dependent mechanism in human myeloid cells. *Blood* 1991; 78: 83-88.
- (146) DOKTER W.H., ESSELINK M.T., HALIE M.R. *et al.*: Interleukin-4 inhibits the lipopolysaccharide-induced expression of c-jun and c-fos messenger RNA and activator protein-1 binding activity in human monocytes. *Blood* 1993; 81: 337-343.
- (147) LORD K.A., ABDOLLAHI A., HOFFMAN-LIEBERMANN B. *et al.*: Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol Cell. Biol.* 1993; 13: 841-851.
- (148) SHABO Y., LOTEM J., SACHS L.: Induction of genes for transcription factors by normal hematopoietic regulatory proteins in the differentiation of myeloid leukemic cells. *Leukemia* 1990; 12: 797-801.
- (149) SHERMAN M.L., STONE R.M., DATTA R. *et al.*: Transcriptional and post-transcriptional regulation of c-jun expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemic cells. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 3320-3323.
- (150) DE GROOT R.P., MEIJER I., VAN DEN BRINK S. *et al.*: Differential regulation of JunB and JunD by adenovirus type 5 and 12 E1A proteins. *Oncogene* 1991; 6: 2357-61.
- (151) KHARBANDA S.M., SHERMAN M.L., KUFE D.W.: Transcriptional regulation of c-jun gene expression by arabinofuranosylcytosine in human myeloid leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 1517-1523.
- (152) KHARBANDA S., DATTA R., KUFE D.: Regulation of c-jun gene expression in HL-60 leukemia cells by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. Potential involvement of a protein kinase C dependent mechanism. *Biochemistry* 1991; 30: 7947-7952.

- (153) RUBIN E., KHARBANDA S., GUNJI H. *et al.*: Activation of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells treated with etoposide. *Mol. Pharmacol.* 1991; 39: 697-701.
- (154) NAKAMURA T., DATTA R., SHERMAN M.L. *et al.*: Regulation of c-jun gene expression by cAMP in HL-60 myeloid leukemia cells. *J Biol. Chem.* 1990; 265: 22011-22015.

Indirizzo dell'autore:

prof. Giuseppe Amadori - Via Monaco Padovano 12 - I-35128 Padova (I)
