

EN

A research project on Diffuse Large B-cell Lymphoma pathobiology will analyze the interconnections between cell signaling emanating from B-cell receptor, CD40, IL6R, IL4R and Toll-like receptors and the regulation of the epigenetic modification represented by histone acetylation. Employing different DLBCL cell lines representative of the main cell of origin (COO) subsets (Germinal Center B cell-type, Activated B-cell-type), the project will analyze the global histone acetylation status as well as the acetylation status of the promoter region of the master regulator gene Activation-induced cytidine deaminase (*AICDA*) coding for the enzyme AID.

The main aims of the project are:

- 1) Assess the contribution of the protein kinase Bruton's Tyrosine Kinase (BTK), Phosphoinositide 3'-kinase (PI3K) and casein kinase 1 and 2 (CK1 and CK2) in the regulation of AID expression. To this purpose loss-of-function (LOF) models will be used. AID expression will be assessed upon inactivation of the kinases and we will analyze *AICDA*-inducing upstream signaling pathways. Immunoblot analysis on protein lysates taken from kinase-deficient DLBCL B cells will examine the activation and/or nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, STAT6, HoxC4, Sp1, Sp3 and Smad2/3, which are the transcription factors most likely to bind regulatory elements on the *Aicd* gene.
- 2) Chromatin immunoprecipitation (ChIP-qPCR) to assess the occupancy of the respective 5' regulatory sites upstream the transcriptional start site by NF- $\kappa$ B, STAT6, HoxC4, Sp1, Sp3, SMAD2/3.
- 3) To focus on protein kinase CK1 and CK2 in mouse models of B cell lymphomas. We will assess whether lymphoma cells from  $Vav^{BCL2}$  and  $CK1a^{BlyKO} \times Vav^{BCL2}$  or  $CK2b^{BlyKO} \times Vav^{BCL2}$  mice display a different level of global histone acetylation and of AID by CHIP-RT-PCR, western blot and qPCR analysis of protein and mRNA levels.

Translational relevance: identification of potential mechanisms suitable of pharmacological therapy.

## IT

Un Progetto di ricerca sulla patobiologia dei Linfomi Diffusi a Grandi Cellule B analizzerà le interconnessioni tra il segnale cellulare che emana dal B cell receptor, CD40, IL6R, IL4R e Toll-like receptors e la regolazione delle modificazioni epigenetiche rappresentate soprattutto dall'acetilazione degli istoni. Utilizzando differenti linee cellulari di DLBCL rappresentative dei principali sottotipi di COO (Germinal Center B cell-type, Activated B-cell-type), il progetto analizzerà lo stato globale di acetilazione degli istoni e della regione promoter del gene master regolatore Activation-induced cytidine deaminase (*AICDA*) che codifica per l'enzima AID.

Gli obiettivi principali del progetto sono:

- 1) Stabilire il contributo di Bruton's Tyrosine Kinase (BTK), Phosphoinositide 3'-kinase (PI3K) e casein kinase 1 and 2 (CK1 and CK2) nella regolazione dell'espressione di AID. A tal scopo si utilizzeranno modelli di loss-of-function (LOF). L'espressione di AID sarà registrata dopo inattivazione delle chinasi e si analizzeranno le vie del segnale a monte induttrici di *AICDA*. Analisi immunoblot sui lisati proteici ottenuti da cellule di DLBCL deficitarie per le chinasi determinerà l'attivazione e/o la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B, STAT6, HoxC4, Sp1, Sp3 e Smad2/3, che sono i fattori trascrizionali più probabili a legare gli elementi regolatori del genen *AICDA*.
- 2) Chromatin immunoprecipitation (ChIP-qPCR) per asdeterminaresess l'occupazione dei rispettivi siti 5' regolatori a mointe del sito di inizio della trascrizione da parte di NF- $\kappa$ B, STAT6, HoxC4, Sp1, Sp3, SMAD2/3.
- 3) Concentrare l'analisi su protein kinase CK1 and CK2 in modelli murini di B cell lymphomas. Si deterinerà se cellule di linfoma da topi VavP<sup>BCL2</sup> e CK1a<sup>BlyKO</sup> x VavP<sup>BCL2</sup> o CK2b<sup>BlyKO</sup> x VavP<sup>BCL2</sup> dimostrano un livello alterato di acetilazione istonica globale of e di AID mediante CHIP-RT-PCR, western blot e qPCR analysis di proteine e livelli di mRNA.

Rilevanza traslazionale: identifacazione di potenziali meccanismi suscettibili di terapia farmacologica