

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

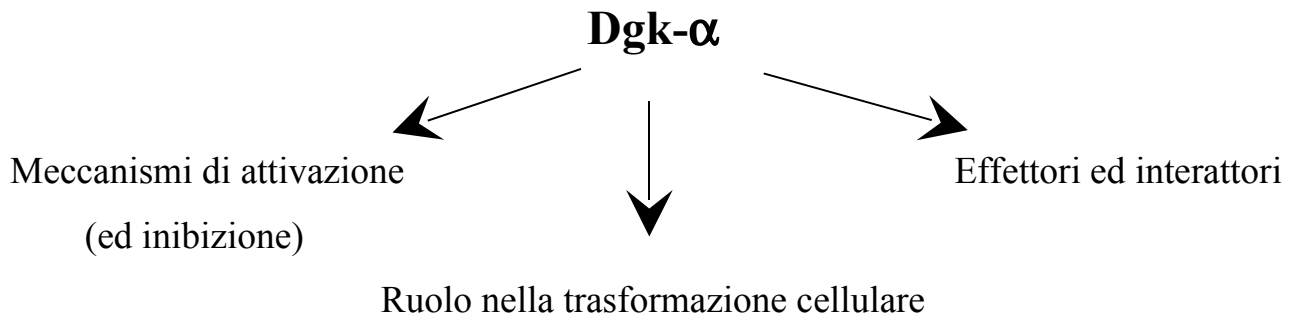
Anno 2006

Relazione annuale del Dott. **Gianluca Baldanzi** III anno, XIX ciclo

**PROGETTO DI RICERCA**

**“MECCANISMI DI ATTIVAZIONE E FUNZIONE DI DGK- $\alpha$ ”**

**Schema del progetto di ricerca presentato per il dottorato**



## Stato delle ricerche svolte dal dottorando

### **1 Meccanismi di regolazione di Dgk- $\alpha$**

Una serie di articoli pubblicati dal mio gruppo di ricerca (Cutrupi et al. 2000, Baldanzi et al. 2004, Bachiocchi et al. 2006) dimostrano che:

1. l'attivazione di Dgk- $\alpha$  in cellule stimolate con fattori di crescita richiede l'attività della tirosina cinasi citoplasmatica Src;
2. Src è in grado di attivare in vitro Dgk- $\alpha$  ed è in grado di fosforilare Dgk- $\alpha$  in vivo;
3. in cellule stimolate con fattori di crescita si osserva la formazione di un complesso Dgk- $\alpha$ /Src.

Per chiarire le modalità di attivazione di Dgk- $\alpha$  nel corso dei precedenti anni di dottorato ho approfondito questa problematica:

- Identificando nella tirosina 335 il principale sito fosforilazione di Dgk- $\alpha$  ad opera di Src. Mutando in fenilalanina la tirosina 335 di Dgk- $\alpha$  si rende l'enzima non fosforilabile sia da Src sia da v-Src.
- Identificando nella fosforilazione della tirosina 335 di Dgk- $\alpha$  un evento necessario sia per l'attivazione dell'enzima. Infatti il mutante Dgk- $\alpha$  Y<sub>335</sub>F non solo non è fosforilato, ma non viene neppure attivato (ne da Src in vitro, ne da vSrc in vivo ne in cellule trattate con HGF).
- Chiarendo il ruolo dell'interazione tra la coda ricca in proline di Dgk- $\alpha$  ed il dominio SH3 di Src. Un mutante privo delle proline (Dgk- $\alpha$   $\Delta$ P) non viene fosforilato da Src ne da vSrc e non viene nemmeno attivato, suggerendo che l'interazione fra la coda ricca in proline di Dgk- $\alpha$  ed il dominio SH3 di Src preceda la fosforilazione.
- Dimostrando, tramite saggi di pull-down, che la tirosina 335 è richiesta per il legame al dominio SH2 di Src mentre la sequenza C terminale ricca in proline è richiesta per il legame al dominio SH3 di Src.
- Infine abbiamo dimostrato che, a differenza di Dgk- $\alpha$  wt, sia Dgk- $\alpha$  Y<sub>335</sub>F sia Dgk- $\alpha$   $\Delta$ P non vengono reclutati alla membrana dopo stimolazione delle cellule con HGF. I due mutanti si accumulano invece in vescicole intra-citoplasmatiche ancora da caratterizzare

Questi studi ci indicano che la tirosina 335 di Dgk- $\alpha$  è un amminoacido chiave per il controllo dell'attività dell'enzima e della sua localizzazione, inoltre questo amminoacido può essere fosforilato e eventualmente legato da domini SH2.

XLP (X linked proliferative disease) è una forma di immunodeficienza ereditaria caratterizzata da una risposta inappropriata al virus Epstein-Barr (EBV). Nei pazienti XLP la mononucleosi non si risolve spontaneamente ma esita bensì in una risposta citotossica sistemica con effetti in genere fatali. In questi pazienti, anche in assenza del virus EBV, si osservano alterazioni del sistema immunitario quali linfomi a cellule B e dis-gammaglobulinemia. Il gene mutato nella XLP è stato identificato e designato SH2D1A/DSHP/SAP; SAP è una proteina di 128 amminoacidi che consiste essenzialmente di un dominio SH2 che lega ad alta affinità una sequenza di consenso T-I/V-(p)Y-x-x-V/I, contenuta nel dominio citoplasmico della superfamiglia di proteine di superficie C2 (SLAM 2B4, CD84, Ly-9 e NTB-A). Un'analisi *in silico* ci ha indicato che una sequenza potenzialmente riconosciuta da SAP è presente intorno alla tirosina 335 della Dgk- $\alpha$  (Ser-Ile-Tyr-Pro-Ser-Val).

Pertanto i) l'identità del consensus, ii) la conservazione dello stesso consensus in specie diverse, iii) la posizione della tirosina 335 in una zona di Dgk- $\alpha$  che si ritiene esposta alla superficie e iv) la dimostrazione del ruolo regolatorio della sua fosforilazione, suggeriscono fortemente che Dgk- $\alpha$  possa interagire con SAP in linfociti T.

I linfociti esprimono principalmente le isoforme alfa e zeta di Dgk, la cui delezione specifica dà luogo a un difetto del differenziamento dei linfociti T e alla loro iperprolifrazione (Zhong et al. 2003 e Gary koretzky comunicazioni personali). Il ruolo di Dgk- $\alpha$  in linfociti T sembra essere duplice: da un lato Dgk- $\alpha$  è necessaria per la proliferazione indotta da Il-2, nello stesso tempo le diacilglicerolo cinasi sono regolatori negativi della trasduzione del segnale del TCR (SanJuan et al. 2001, SanJuan et al. 2003, Jones et al. 2002).

Confortati dalla omologia della sequenza intorno alla tirosina 335 di Dgk- $\alpha$  al consensus per il legame a SAP abbiamo voluto verificare l'esistenza del complesso Dgk- $\alpha$ /SAP osservando che:

1. *In vivo* in cellule esprimenti entrambe le proteine (PBL, Jurkat e MOLT-4) una attività diacilglicerolo cinasi co-immunoprecipita con SAP. Il fatto che l'attività diacilglicerolo cinasi associata a SAP sia sensibile all'inibitore R59949 esclude la possibilità che si tratti della Dgk- $\zeta$  e suggerisce che con SAP immunoprecipiti la Dgk- $\alpha$ .
2. Le due proteine possono essere co-immunoprecipitate. Infatti in cellule Jurkat e PBL Dgk- $\alpha$  è presente in immunoprecipitati anti SAP e SAP è presente in immunoprecipitati anti myc di cellule jurkat trasfettate con myc-Dgk- $\alpha$ .

3. *In vitro* Dgk- $\alpha$  è in grado di associare SAP in un saggio di interazione in cui SAP ricombinante purificato immobilizzato su matrice è in grado di catturare sia DGK ricombinante purificata, sia Dgk- $\alpha$  proveniente da un estratto grezzo di cellule COS-7.

Inoltre abbiamo approfondito l'effetto della stimolazione di SLAM e del TCR sull'attività enzimatica di Dgk- $\alpha$ . A questo scopo Dgk- $\alpha$  endogena è stata immunoprecipitata con anticorpi specifici da cellule Jurkat o da PBL stimolati con anticorpi agonisti di SLAM e del TCR e l'attività Dgk- $\alpha$  misurata mediante saggio enzimatico con substrati esogeni. Abbiamo potuto osservare che la stimolazione di SLAM e del TCR causa una netta diminuzione dell'attività dell'enzima (diminuzione di circa il 50% in Jurkat e del 90% in PBL). Risultati analoghi sono stati ottenuti in cellule Jurkat trasfettate con myc Dgk- $\alpha$  ed immunoprecipitate con anticorpi anti myc (riduzione del 50% dell'attività myc-Dgk- $\alpha$  in cellule trattate con anti CD3 e anti SLAM). Questi dati sono in linea con il ruolo di regolatore negativo che Dgk- $\alpha$  svolge nella trasduzione del segnale dei linfociti T (SanJuan et al. 2001, SanJuan et al. 2003, Jones et al. 2002) e suggeriscono che SAP non serva a reclutare ed attivare Dgk- $\alpha$  presso SLAM attivato. Coerentemente il nostro modello prevede che le interazioni di SAP con Dgk- $\alpha$  e con SLAM siano mutualmente esclusive in quanto coinvolgono il medesimo sito di legame.

Nel corso dello stesso lavoro sono stati generati reagenti che facilitino lo studio dell'interazione Dgk- $\alpha$ /SAP in un contesto più fisiologico. Utilizzando il sistema Gateway abbiamo clonato da linfociti attivati sia SAP sia SLAM. Sono stati quindi generati dei vettori di espressione per cellule eucariote codificanti per SAP e per SLAM fusi in frame con la green fluorescent protein (per studi di localizzazione) o con l'epitopo V5 (per il riconoscimento con anticorpi specifici). Questi vettori permetteranno lo studio della regolazione e della localizzazione del complesso SAP/Dgk- $\alpha$  nei linfociti.

## 2 Ruolo di Dgk- $\alpha$ nella trasformazione cellulare

Nei precedenti anni di dottorato abbiamo iniziato ad approfondire il ruolo di Dgk- $\alpha$  nei linfomi utilizzando come modello i linfomi anaplastici a grandi cellule positivi per l'oncogene NPM/ALK. In questo sistema cellulare abbiamo dimostrato che l'oncogene NPM-ALK è in grado di attivare Dgk- $\alpha$  ed anche in questo caso l'attivazione richiede l'attività tirosina cinasica di Src con cui Dgk- $\alpha$  forma un complesso. Dal punto di vista funzionale abbiamo osservato che l'inibizione di Dgk- $\alpha$  (ottenuta con inibitori farmacologici quali R59949 o tramite siRNA specifici) blocca la proliferazione di linee cellulari esprimenti NPM-ALK, tra cui linee cellulari umane direttamente derivate da linfomi anaplastici a grandi cellule. Questo risultato indica che Dgk- $\alpha$  è necessaria per la proliferazione indotta da NPM-ALK nei linfociti e suggerisce che Dgk- $\alpha$  sia un potenziale bersaglio per una terapia farmacologica antineoplastica mirata (Bachocchi et al. 2005).

Nel corso del presente anno di dottorato abbiamo voluto approfondire gli effetti dell'inibizione di Dgk- $\alpha$  in linee cellulari derivate da linfomi. Come primo modello abbiamo utilizzato cellule MOLT-4 (linfoblasti T da una leucemia linfoblastica acuta che esprime alti livelli di Dgk- $\alpha$ ). Utilizzando i vettori lentivirali sviluppati dal dottorando Paolo Porporato abbiamo ottenuto sia cellule di controllo infettate con il solo vettore, sia cellule infettate stabilmente con uno shRNA che interferisce specificamente con il messaggero di Dgk- $\alpha$ . Nelle cellule infettate con lo shRNA specifico per Dgk- $\alpha$  si osserva una diminuzione del 70% di Dgk- $\alpha$  (misurata come proteina in western blot) e parallelamente una forte riduzione del tasso di proliferazione e della sintesi di DNA. Questo effetto è coerente con quanto osservato in altri modelli cellulari (Bachocchi et al. 2005) sottolineando le potenzialità applicative di inibitori di Dgk- $\alpha$  nel controllo farmacologico della proliferazione linfocitaria.

Inoltre abbiamo studiato gli effetti di R59949, un inibitore di DGK- $\alpha$ , in cellule Jurkat A3 (linfoblasti T da una leucemia linfoblastica acuta). Concentrazioni di inibitore che portano ad una totale inibizione di Dgk- $\alpha$  (10  $\mu$ M) causano una forte inibizione della sintesi di DNA e della produzione di IL-2 indotte da stimolazione con anticorpi anti CD3 ed anti CD28. Sorprendentemente basse dosi di inibitore (1  $\mu$ M) causano invece un moderato ma significativo aumento della proliferazione cellulare e del rilascio di IL-2. Probabilmente questi dati, apparentemente poco coerenti, riflettono il duplice ruolo che l'attuale letteratura propone per Dgk- $\alpha$  che sembra essere richiesta per la progressione G1-S nei linfociti T (Flores et al. 1996) ma che gli

stessi autori presentano come un regolatore negativo del signalling del TCR (SanJuan et al. 2001, SanJuan et al. 2003, Jones et al. 2002).

### 3 Ricerca di effettori/interattori di Dgk- $\alpha$

Mentre è ormai ben documentato il ruolo di Dgk- $\alpha$  nella trasduzione del segnale in vari tipi cellulari poco si sa sugli effettori del segnale trasmesso da Dgk- $\alpha$ . E' logico ipotizzare che Dgk- $\alpha$  agisca rimuovendo dalla membrana proteine leganti il DAG e parallelamente producendo PA in grado di legare ed attivare molteplici enzimi (Topham 2006). E' ormai ben chiaro che i secondi messaggeri lipidici quali PA e DAG vengono prodotti in zone specifiche della membrana e spesso agiscono su molecole bersaglio prossime al sito di produzione o comprese in uno stesso complesso macromolecolare; ad esempio varie Dgk (ma non la  $\alpha$ ) associano con membri della famiglia di PKC regolando la disponibilità di DAG per queste importanti serine chinasi (Yamaguchi et al. 2006, Luo et al. 2003). Per chiarire il ruolo di Dgk- $\alpha$  nella trasduzione del segnale risulta quindi fondamentale individuare gli interattori di Dgk- $\alpha$  nelle diverse condizioni fisiologiche.

La strategia da me seguita per individuare interattori di Dgk- $\alpha$  si basa sulla trasfezione di myc-Dgk- $\alpha$  in cellule umane (HEK 293T), la sua immunoprecipitazione con anticorpi anti myc tag, la separazione dell'immunoprecipitato tramite SDS-PAGE e sulla individuazione tramite spettrometria di massa di eventuali interattori (effettuata da Daniela Pagnozzi nel laboratorio di P. Pucci, Napoli). Un primo esperimento ci ha permesso di identificare ANNESSINA I come un possibile interattore di Dgk- $\alpha$ . Per confermare questo importante risultato stiamo determinando le condizioni per co-immunoprecipitare le due proteine in cellule non sovraesprimenti (immunoprecipitazione anti Dgk- $\alpha$  blot anti annesina I e viceversa). Inoltre la presenza di un rilevante background nel primo esperimento ci spinge a ripetere lo stesso cambiando il tag utilizzato per l'immunoprecipitazione; a questo fine sto clonando Dgk- $\alpha$  in un vettore caratterizzato dal Tag V5 invece del tag myc fin qui utilizzato.



## **Bibliografia**

Bacchiocchi R, Baldanzi G, Carbonari D, Capomagi C, Colombo E, Blitterswijk WJ, Graziani A and Fazioli F ( 2005) Blood 106(6):2175-82

Baldanzi G., Mitola S., Cutrupi S., Filigheddu N., Blitterswijk WJ, Sinigaglia F., Bussolino F, Graziani A. (2004) Oncogene. 23:4828-4838

Cutrupi S., Baldanzi G., Gramaglia D., Maffè A., Schaap D., Giraudo E., van Blitterswijk W. J., Bussolino F., Comoglio P. M. e Graziani A. (2000) The Embo Journal 19, 4614-4622

Flores I et al. Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation. J. Biol. Chem. 1996; 271: 10334-10340.

Luo B, Prescott SM, Topham MK. Protein kinase C alpha phosphorylates and negatively regulates diacylglycerol kinase zeta. J Biol Chem. 2003 Oct 10;278(41):39542-7.

Jones DR, Sanjuan MA, Stone JC, Merida I. (2002) FASEB J. 16(6):595-7.

Sanjuan MA, Pradet-Balade B, Jones DR, Martinez-A C, Stone JC, Garcia-Sanz JA, Merida I. (2003) J Immunol. 170(6):2877-83.

Sanjuan MA, Jones DR, Izquierdo M, Merida I. (2001) J Cell Biol. 153(1):207-20.

Topham MK. Signaling roles of diacylglycerol kinases. (2006) J Cell Biochem.

Xiao-Ping Zhong et al. Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase  $\zeta$  deficiency , Nature Immunology 4, 882 - 890 (2003)

Yamaguchi Y, Shirai Y, Matsubara T, Sanse KI, Kuriyama M, Ohshiro N, Yoshino KI, Yonezawa K, Ono Y, Saito N. Phosphorylation and upregulation of diacylglycerol kinase gamma via its interaction with protein kinase Cgamma. J Biol Chem. 2006 Aug 11

# DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

Anno 2006

Attività svolte dal Dott. **Gianluca Baldanzi** III anno, XIX ciclo

## Seminari frequentati:

1. Mercoledì 15 Febbraio 2006 “Anticorpi Ricombinanti: Un Potente Tool Biotecnologico” Prof. Daniele Sblattero
2. Lunedì 13 Marzo 2006 ‘Il Trapianto Di Cellule Endoteliali (Lsec) Nel Fegato Di Topo Ha Implicazioni Per La Terapia Cellulare E Genica Dell'emofilia.’ Dr. Antonia Follenzi
3. Giovedì 4 maggio 2006 “Il mesotelioma un modello di terapia traslazionale” Dr L. Mutti
4. 30 Maggio 2006 “Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni” Marialuisa Lavitrano
5. 15-6-2006 “Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptive cardiac remodeling to pressure overload” Guido Tarone
6. 27 giugno 2006 “osteointegrazione e superfici implantari” Lia Rimondini
7. Mercoledì 5 Luglio 2006 “DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccines design” Renata Grifantini
8. Lunedì 11 settembre 2006 “ The role of cathepsin k in arthritis and atherosclerosis” Dieter Brömme

## Congressi frequentati:

Sono stato relatore a:

1. Convegno annuale della sezione Ligure-Lombardo-Piemontese della società italiana di biochimica e biologia molecolare, Pavia 19 maggio 2006
2. Workshop SIICA-SIC “Angiogenesi: basi molecolari ed implicazioni terapeutiche” CERTOSA DI PONTIGNANO (Siena) 5-7 Giugno 2006
3. Congresso SIB 2006 - Riccione 28-30 settembre

Altri congressi frequentati

4. “La proteomica in piemonte acquisizioni e sviluppi nei settori ambientale, clinico e alimentare” Torino, 20 gennaio 2006
5. “Lipidi e segnali cellulari” Molini Marzoli Busto Arsizio, venerdì 7 aprile 2006
6. Proteine 2006, Novara, 1-3 Giugno, 2006
7. IX Congresso nazionale CIB 7-9 settembre 2006 Torino

Ho fatto parte del Comitato Organizzatore Locale del congresso “Proteine 2006” tenutosi a Novara presso la ex caserma Perrone dal 1 al 3 Giugno 2006

Pubblicazioni:

Allegato alla presente relazione

- Carini R, Alchera E, De Cesaris MG, Splendore R, Piranda D, Baldanzi G, Albano E. Purinergic P2Y(2) receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. J Hepatol. 2006 Apr 6;

Novara, 25/09/06

Dr. Gianluca Baldanzi