

RELAZIONE ANNUALE DEL LAVORO DI RICERCA

SVOLTO DA

***FEDERICA CHIANALE***

NELL'ANNO 2005-2006

DOTTORATO DI RICERCA IN

***MEDICINA MOLECOLARE***

***CICLO XVIII***

TUTOR: ***PROF. GRAZIANI***

# ***INDICE***

- 1. INTRODUZIONE***
- 2. RISULTATI E COMMENTO (Legende delle figure)***
- 3. FIGURE***
- 4. MATERIALI E METODI***
- 5. BIBLIOGRAFIA***
- 6. PRODUZIONE SCIENTIFICA***
- 7. SEMINARI IV ANNO***

# 1. INTRODUZIONE

Alla famiglia delle diacilglicerolo cinasi appartengono 10 isoforme di enzimi che catalizzano la fosforilazione del diacilglicerolo (DAG) ad acido fosfatidico (PA) (1,2). Il DAG è regolatore di numerosi enzimi attraverso il legame ai domini C1 definiti "tipici" -per distinguerli da quelli "atipici", caratterizzati da omologia di sequenza coi C1 "tipici" ma incapaci di legare DAG- come ad esempio le PKC, RasGRPs (Ras Guanosine Releasing Proteins) e chimerine (dei Rac GAP, GTPase Activating Proteins). D'altra parte, anche PA è un noto regolatore di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, sebbene non sia stato identificato alcun dominio di legame conservato per questo secondo messaggero; fra le proteine regolate da PA si possono ricordare mTor, Raf, PKCs atipiche, PI4P-5 cinasi, RhoGDI (Rho-family Guanine Dissociation Inhibitor) e p190 Rho-GAP (3). Da questa semplice premessa emerge come le Dgks possano costituire gli interruttori molecolari in grado di regolare il maniera reciproca i livelli di DAG e PA, contribuendo alla terminazione dei segnali mediati da DAG e all'attivazione di quelli mediati da PA. Le diverse isoforme di Dgks sono variamente espresse in tessuti e tipi cellulari differenti e la loro funzione è specifica e non necessariamente vicariata dal presenza di un'isoforma diversa all'interno della medesima cellula, indicando come ciascuna isoforma abbia quindi una sua specificità d'azione, all'interno di vie differenti di trasduzione del segnale (1).

Le isoforme di Dgks  $\alpha$ ,  $\zeta$ ,  $\theta$  hanno un ruolo ben dimostrato nella trasduzione dei segnali a valle di recettori di superficie (4,5). In linfociti T, Dgk $\alpha$  e  $\zeta$ , attraverso l'interazione rispettivamente con RasGRP e PKC, up-regolano la sensibilità all'attivazione del TCR attraverso la modulazione negativa dell'intensità e delle cinetiche di segnali mediati da DG (6,4,7). Al contrario, i mastociti derivati da topo knock-out per Dgk $\zeta$  sono caratterizzati da una diminuita degranolazione, che correla con un'alterazione dell'attivazione di PLC $\gamma$  e della risposta ai segnali di calcio, eventi entrambi dipendenti dalla produzione di PA (8).

L'attivazione di Dgk $\alpha$  in seguito a stimolazione di recettori tirosina-cinasi (RTKs) è stata dimostrata in diversi sistemi cellulari. In linfociti T, l'attivazione di Dgk $\alpha$  è necessaria per il segnale proliferativo dell'IL-2, mentre nei linfociti di pazienti malati di linfoma

anaplastico, dovuto alla traslocazione NPM-ALK che rende costitutivamente attivo il recettore tirosina-cinasi ALK, Dgk $\alpha$  risulta costitutivamente attivata (9,10). In cellule endoteliali, Dgk $\alpha$  media i segnali chemotattici e proliferativi di HGF e VEGF, risultando necessaria per la motilità cellulare e per l'angiogenesi (11,12). In tutti i sistemi sopra descritti, l'attivazione di Dgk $\alpha$  è dipendente dall'attività cinasica delle tirosina-cinasi della famiglia di Src, mentre i dettagli molecolari degli eventi a valle di Dgk $\alpha$  e da questa regolati non sono tuttora noti.

In cellule epiteliali, HGF induce migrazione, scatter e invasione, che possono essere considerati singoli aspetti del fenomeno denominato transizione epitelio-mesenchima (EMT). L'EMT è un processo fisiologico caratteristico dello sviluppo embrionale e della riparazione tissutale, che avviene in modo rigidamente controllato. Nella EMT cellule epiteliali appartenenti ad un tessuto si dissociano da esso assumendo caratteristiche fibroblastoidi mediante perdita della polarità basolaterale e delle giunzioni cellula-cellula, downregolazione dei geni che codificano per molecole dell'adesione e acquisizione di motilità (scatter); talvolta le cellule iniziano anche la produzione di matrice extracellulare o di proteasi della matrice, per facilitare l'invasione e la motilità. Questo tipo di processo è ugualmente caratteristico delle cellule di carcinomi epiteliali che assumono un fenotipo invasivo (13).

La migrazione cellulare è accompagnata dal riarrangiamento del citoscheletro, che implica ad esempio la formazione di ruffles e lamellipodi al fronte migratorio, la retrazione della parte posteriore della cellule, la scomparsa dell'actina corticale, la continua formazione-distruzione di fibre di stress ed il turnover delle adesioni focali. Nel modello cellulare epiteliale delle MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells), HGF induce spreading delle colonie, formazione di lamellipodi e rimodellamento dell'actina corticale, traslocazione della Paxillina (importante proteina delle adesioni focali, che assolve alla duplice funzione strutturale e di segnalazione) dal citosol alle adesioni focali sulle quali si ancorano le fibre di stress (14,15); nel medesimo modello cellulare, la sovraespressione dell'adattatore molecolare Crk, che fisiologicamente si pone a valle della segnalazione dei recettori tirosina-cinasi di superficie, induce di per sé la traslocazione della paxillina alle adesioni focali, con un meccanismo dipendente dalla piccola GTPasi Rac (16). In cellule MDCK, ed modelli epiteliali in generale, Rac viene attivato da HGF e media tutti i cambiamenti morfologici del citoscheletro sopra elencati (17,14).

Rac è una piccola proteina G appartenente alla famiglia delle Rho GTPasi, che riveste un ruolo fondamentale nella regolazione dei cambiamenti citoscheletrici nei

fenomeni di motilità ed adesione. In generale, tutte le piccole proteine G legano nello stato inattivo il nucleotide difosfato GDP e, quando vengono attivate, principalmente a valle della segnalazione di recettori di superficie, scambiano il GDP col corrispondente nucleotide trifosfato GTP. Lo stato di legame al GTP le rende attive, ovvero in grado di interagire coi propri effettori e di regolarne l'attività. Infine, la loro intrinseca attività GTPasica porta all'idrolisi di un gruppo fosfato del GTP e quindi il GTP ritorna a trasformarsi in GDP, "spegnendo" il segnale da esse innescato. Molteplici sono i meccanismi di regolazione di proteine chiave per i riarrangiamenti citoscheletrici quali sono le piccole GTPasi della famiglia di Rho. GEFs (Guanosine nucleotide Exchange Factors) e GAPs (GTPase activating factors) sono responsabili di attivare o inattivare le piccole GTPasi promuovendo rispettivamente il legame con il GTP o la sua idrolisi a GDP. Un'ulteriore livello di controllo è costituito da RhoGDI (GDP Dissociation Inhibitor), che lega nel citoplasma le piccole GTPasi nel loro stato inattivo e previene la loro attivazione regolandone l'accesso alla membrana e quindi la possibilità di interazione con gli effettori.

L'inibizione di Dgk $\alpha$  mediante un suo inibitore farmacologico R59949 produce un difetto di motilità in cellule epiteliali stimulate con HGF e corrispondenti alterazioni a livello molecolare (descritti nella relazione finale dello scorso Anno Accademico), che fortemente correlano con un difetto di segnalazione di Rac. Questa osservazione è stata la base di tutto il filone di esperimenti che ha come oggetto di interesse l'interazione funzionale fra Dgk $\alpha$  e Rac in cellule MDCK stimulate con HGF. Nella relazione finale dello scorso AA, avevo già evidenziato come il trattamento con R59949 portasse ad un difetto di attivazione e di traslocazione di Rac in seguito a trattamento con HGF.

### **Piano sperimentale:**

In questo anno, ho perfezionato i risultati precedentemente ottenuti mediante la generazione di linee cellulari stabilmente esprimenti un mutante cataliticamente inattivo di Dgk $\alpha$ , che funziona da dominante negativo. Inoltre, ho messo a punto un semplice sistema sperimentale per verificare che è proprio l'acido fosfatidico prodotto da Dgk $\alpha$  il segnale mancante nelle cellule in cui Dgk $\alpha$  è inibita e che, di conseguenza, non rispondono agli stimoli motogenici di HGF. Infine, ho iniziato l'esplorazione dei possibili meccanismi con i quali Dgk $\alpha$  potrebbe regolare l'attività di Rac.

## **2. RISULTATI E COMMENTO**

### **L'attività di Dgk $\alpha$ è necessaria per l'attivazione di Rac indotta da HGF**

L'attività di Rac è cruciale per il movimento cellulare. HGF induce una precoce rapida e transiente attivazione di Rac, dipendente da PI 3-kinase, e l'attività di Rac è necessaria per la formazione dei lamellipodi, per lo spreading e la dissociazione di colonie epiteliali di MDCK indotte da HGF (18,19) .

Cellule MDCKpincos (infettate col vettore vuoto) e MDCKpincos/Dgk $\alpha$ -KD sono state stimulate con 100 ng/ml di HGF per 15'. La frazione di Rac attivo, legato al GTP, è stata purificata mediante pull-down con la proteina di fusione costituita dal dominio di PAK che lega RacGTP fuso con GST. Come evidenziato in **figura 1**, HGF induce attivazione di Rac solo in cellule MDCKpincos, mentre non si rileva presenza di RacGTP in cellule MDCKpincos/Dgk $\alpha$ -KD.

Poiché la maggior parte dei GEFs di Rac sono attivati dal prodotto di PI 3-K (20) ,ho verificato se l'assenza di attività Dgk $\alpha$  potesse influire sulla via di segnalazione a valle di PI 3-K: la persistenza di fosforilazione di Akt, noto e importante effettore di PI 3-K, anche in cellule MDCKpincos/Dgk $\alpha$ -KD stimulate con HGF, indica che la regolazione esercitata da Dgk $\alpha$  su Rac è indipendente da PI 3-K.

### **L'attività di Dgk $\alpha$ è necessaria per la traslocazione di Rac alla membrana plasmatica indotta da HGF.**

HGF induce in cellule MDCK la traslocazione di Rac alla membrana in corrispondenza dei ruffles alle estremità dei lamellipodi (12). Per le piccole proteine G della famiglia di Rho e quindi anche per Rac, è fondamentale una corretta localizzazione subcellulare al fine realizzare un'interazione "produttiva" fra le forme attive, legate al GTP, e gli effettori. Esperimenti di FRET hanno dimostrato come la forma attiva di Rac sia localizzata al leading edge di cellule epiteliali migranti (21). E' stato dimostrato inoltre che per una corretta localizzazione di Rac alla membrana cellulare è necessario una segnale integrinico che si concretizza con la formazione di lipid raft (22).

Ho osservato al microscopio confocale la localizzazione di Rac in seguito a stimolazione con HGF di cellule MDCKpincos e pincos/Dgk $\alpha$ -KD. Ho contato la percentuale di cellule infettate (esprimenti GFP) posizionate a bordo colonia che mostrassero un chiaro staining di Rac alla membrana esterna. In cellule infettate col vettore vuoto il trattamento con HGF induce un incremento di tale percentuale da circa 20% a circa il 60%. Al contrario, in cellule MDCKpincos/Dgk $\alpha$ -KD, la percentuale di cellule infettate a bordo colonia che presenta Rac alla membrana esterna si attesta intorno al 20% sia in cellule controllo sia stimulate con HGF (**figura 2**).

### **L'acido fosfatidico è un segnale determinante nella segnalazione motogenica indotta da HGF**

Recenti dati di letteratura dimostrano che la PLD, producendo acido fosfatidico a partire da fosfatidilcolina, media motilità in cellule epiteliali attraverso una transattivazione del recettore dell'EGF (23). Questo dato ci ha spinti a provare se ripristinando il segnale che viene a mancare quando Dgk $\alpha$  è inibita, ovvero se la semplice aggiunta di PA potesse operare un "rescue" del fenotipo motile difettivo di cellule MDCKpincos/Dgk $\alpha$ -KD rispetto a MDCKpincos.

L'aggiunta di HGF alla concentrazione di 20 ng/ml per una notte induce scatter delle colonie epiteliali di cellule MDCKpincos, che si disassemblano completamente, mentre non è in grado di far allontanare fra di loro cellule MDCKpincos/Dgk $\alpha$ -KD, sebbene queste di stacchino le une dalle altre e quanto meno diano inizio ad un cambiamento morfologico verso un fenotipo fibroblastoide. Di per sé, l'aggiunta di PA 150  $\mu$ M (me è efficace fino a circa 50  $\mu$ M) induce scatter sia in cellule MDCK infettate col vettore vuoto, sia con il mutante dominante negativo di Dgk $\alpha$  e ripristina lo scatter dipendente da HGF in cellule MDCKpincos/Dgk $\alpha$ -KD (**figura 3**).

Questo esperimento presenta evidenti "grossolanità", dovute principalmente al fatto che la produzione di PA da parte di Dgk $\alpha$  in risposta ad HGF sicuramente è fisiologicamente strettamente localizzata, presumibilmente al leading edge dove vediamo traslocare Dgk $\alpha$  stessa. Al contrario, nell'esperimento descritto, l'aggiunta di PA al mezzo di coltura "investe" in modo del tutto casuale e globale tutta la colonia. Rileviamo comunque che l'effetto risulta specifico, in quanto né LPA né DAG, di cui PA è precursore, sono in grado di indurre scatter di MDCK (23). Questo dato, inoltre, suggerisce che la sola presenza di una forma costitutivamente attiva di Dgk $\alpha$  sarebbe in grado di generare movimento cellulare. Oltre che in questa direzione, stiamo anche pianificando di provare

ad utilizzare concentrazioni sub-ottimali di PA, non in grado di per sé di indurre scatter, in modo da verificare se, anche a basse concentrazioni, il PA aggiunto sia in grado di ripristinare il segnale motogenico di HGF in cellule difettive per attività di Dgk $\alpha$ . In questo caso, la segnalazione innescata da HGF che passa per Dgk $\alpha$  si configurerebbe come una via necessaria, ma non di per sé sufficiente al movimento cellulare.

### **Dgk $\alpha$ e Rac formano un complesso costitutivo**

Le osservazioni effettuate in microscopia confocale sulla localizzazione di Dgk $\alpha$  e Rac in cellule MDCK stimulate o meno con HGF indicano che entrambe queste proteine hanno una localizzazione prevalentemente citoplasmatica in cellule non stimulate, mentre traslocano alla membrana plasmatica in corrispondenza del leading edge in seguito a stimolazione con fattori motogenici. L'evidente interrelazione funzionale rilevata fra di esse fa supporre che in qualche modo Dgk $\alpha$  controlli l'attività di Rac.

Numerose evidenze indicano che diverse isoforme di Dgks sono coinvolte nella regolazione di piccole GTPasi. Ad esempio, Dgk $\zeta$  e Dgk $\iota$  regolano negativamente rispettivamente Ras e Rap attraverso la conversione in PA del DAG, che attiverrebbe lo scambiatore RasGRP (GDP-Releasing Protein), con il quale formano un complesso molecolare (24,25). Concordemente, l'espressione di un mutante dominante negativo di Dgk $\alpha$  in cellule T rafforza il segnale di RasGRP (26,27). Dgk $\theta$  in mammiferi e Dgk-1 in *C.elegans* legano direttamente Rho nella sua forma attiva e ne sono inibite (28,29). Dgk $\gamma$  e  $\zeta$  associano con Rac indipendentemente dal suo stato di attivazione (30,31), regolandolo apparentemente in maniera opposta. In cellule di neuroblastoma, Dgk $\zeta$  lega Rac mediante la sua regione contenente i domini C1 atipici, colocalizza con Rac al leading edge e formazione di neuriti indotta da Dgk $\zeta$  risulta essere dipendente da Rac (31). In fibroblasti, una forma costitutivamente attiva di Dgk $\gamma$  mantiene Rac in una configurazione inattiva, bloccando il ruffling indotto da PDGF. Al contrario, l'inibizione di Dgk $\gamma$  mediante R59949 o espressione di un mutante dominante negativo sarebbe sufficiente a generare ruffling, fenomeno dipendente da Rac (30). In questo modello, Dgk $\alpha$  si comporta in modo del tutto diverso dall'isoforma  $\gamma$ , risultando incapace di generare cambiamenti morfologici e del citoscheletro di actina e indicando come i modelli cellulari di fibroblasti e cellule epiteliali possano essere radicalmente diversi.

Data l'interazione funzionale fra Dgk $\alpha$  e Rac, ho voluto verificare se le due proteine interagissero fra loro anche fisicamente. Myc-Dgk $\alpha$  è stata trasfettata transientemente in

cellule 293T ed immunoprecipitata. Negli immunoprecipitati anti-Myc, sia in cellule stimulate, sia in cellule controllo, è identificabile la proteina Rac endogena, indicando che fisiologicamente Dgk $\alpha$  e Rac interagiscono (**figura 4**).

La ricerca del meccanismo molecolare attraverso il quale Dgk $\alpha$  regola la funzione di Rac nel movimento cellulare rappresenta il logico orizzonte di sviluppo del piano sperimentale.

Alcune ipotesi andranno sicuramente verificate:

- il complesso Rac-RhoGDI, in vitro, si dissocia in presenza di PA (32). Dgk $\alpha$  potrebbe produrre quel fattore lipidico che serve per permettere il distacco di Rac da RhoGDI, premessa fondamentale per la sua attivazione e traslocazione alla membrana.
- Le beta-chimerine sono GAPs attivati da DAG, che le recluta in membrana nei siti dove esercitano la loro funzione (33). Dgk $\alpha$  potrebbe rappresentare il nodo di una via “permissiva” che consuma DAG e “allontana” questi regolatori negativi di Rac.
- Dgk $\alpha$  potrebbe, attraverso un meccanismo molecolare ancora ignoto, regolare l'attività o la localizzazione di qualche GEF.

### **Legende delle figure:**

#### **Figura 1:**

**(a)** Cellule MDCK sono state mantenute in terreno privo di siero per una notte, trattate con HGF 100 ng/ml per 15' in presenza o in assenza di R59949 1  $\mu$ M e lisate. RacGTP è stato purificato mediante pull-down con GST-PAK CRIB domain. In seguito ad analisi densitometrica delle bande separate mediante SDS-PAGE ed evidenziate con anticorpo anti-Rac, sono stati calcolati i rapporti RacGTP/Rac totale. L'attivazione è espressa come percentuale di attivazione rispetto a cellule trattate con HGF. Gli istogrammi sono rappresentativi di 3 esperimenti; le barre rappresentano gli errori standard;  $p < 0,05$ .

**(b)** MDCKpincos e pincos/Dgk $\alpha$ -KD, mantenute una notte in terreno privo di siero, sono state trattate con 100 ng/ml di HGF per 15' e la purificazione di RacGTP è avvenuta mediante pull-down come descritto sopra.

**Figura 2:**

**(a)** MDCKpincos e pincos/Dgk $\alpha$ -KD sono state mantenute una notte in terreno privo di siero e quindi trattate per 15' con HGF 10 ng/ml. E' stata calcolata la percentuale di cellule a bordo colonia, infettate, che presentano Rac alla membrana plasmatica esterna. Media di 3 esperimenti con errori standard;  $p < 0,05$ .

**(b)** Immunofluorescenza anti-Rac (rosso) nei pannelli A,D,G,J. Pannelli B,E,H,K: cellule infettate (GFP). Le frecce spesse indicano la presenza di Rac alla membrana plasmatica in cellule infettate con il vettore pincos vuoto; le frecce sottili indicano la presenza di Rac alla membrana plasmatica di cellule non infettate. Scala = 20  $\mu$ m. Sono mostrati campi rappresentativi.

**Figura 3:**

Cellule MDCKpincos e pincos/Dgk $\alpha$ -KD sono state trattate per 24 ore come indicato (HGF 20 ng/ml, LPA 300  $\mu$ M, PA 150  $\mu$ M) e quindi fotografate attraverso obiettivo 20x.

**Figura 4:**

Cellule 293T sono state trasfettate con Myc-Dgk $\alpha$ -WT. Dopo una notte in terreno privo di siero sono state stimulate con 100 ng/ml di HGF per i tempi indicati. Immunoprecipitati anti-Myc sono stati risolti mediante SDS-PAGE e decorati con anti-Myc e anti-Rac.

## **4. MATERIALI E METODI**

### **Colture cellulari e trasfezione:**

Cellule MDCK (Madin-Darby Canine Kidney epithelial cells) e 293T sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). I terreni di coltura sono stati supplementati col 10% di FBS ed addizionati con L-glutammina ed una soluzione premiscelata di streptomicina, penicillina e anfotericina-B (Sigma), secondo le indicazioni della casa produttrice.

Le trasfezioni transienti in cellule 293T sono state eseguite con il metodo del calcio-fosfato utilizzando il kit Invitrogen, secondo le indicazioni della casa produttrice.

Le linee stabilmente esprimenti in vettore retrovirale vuoto pincos o il mutante cataliticamente inattivo di Dgk $\alpha$  (G<sub>434</sub>D) (REF EMBO) sono state ottenute mediante infezione. Cellule packaging GP2-293 (Clontech) sono state trasfettate transientemente mediante Lipofectamine2000 Reagent (Invitrogen) con il vettore-envelope pVSV-G (Clontech) e pincos o pincos/Dgk $\alpha$ -KD in Opti-Mem (Invitrogen). Il giorno successivo il mezzo di coltura è stato cambiato con DMEM al 10% FBS. A 48 ore dall'infezione, il soprannatante contenente i virioni è stato raccolto, centrifugato a 1500g, filtrato con un filtro con pori da 45  $\mu$ m e addizionato con Polybrene 8  $\mu$ g/ml. Cellule MDCK piastrate su piastre da 6 pozzetti sono state infettate mediante addizione di 2 ml di soprannatante e 1 ml di terreno di coltura. Il giorno successivo a questa prima infezione, le cellule sono state re-infettate come descritto precedentemente. 16 ore dopo, le cellule sono state coltivate e mantenute in normale terreno di crescita. L'efficienza di infezione è stata stimata essere dell'80% attraverso analisi al FACS e/o osservazione e conta al microscopio delle cellule esprimenti GFP.

### **Reagenti:**

rhHGF (Peprotech), disciolto in PBS 1% ad una concentrazione finale di 1ng/ $\mu$ l, è stato utilizzato, come indicato di volta in volta, alle concentrazioni e tempi indicati, in terreno privo di siero dove non altrimenti specificato.

C<sub>8</sub>-PA (Avanti Polar Lipids) e oleyl-LPA (Sigma) sono stati risospesi come indicato dai rispettivi data-sheets. Il giorno di utilizzo, sono stati essiccati in atmosfera di azoto e risospesi mediante sonicazione in una miscela di 25 mM HEPES, 4 mM EGTA in PBS, filtrata.

Anti-Rac1 e anti-Myc clone 9E10 da Upstate. Anti-P-AKT da Biosource. Anti-AKT da Cell Signaling. Anti-tubulina da Sigma.

Anticorpi secondari coniugati TRITC da DAKO, coniugati HRP da NEN.

#### **RacGTP pull-down assay:**

Rac attivo è stato rilevato mediante pull-down da lisati cellulari con la forma fusa a GST del dominio CRIB di PAK, effettore di Rac, come descritto nelle precedenti relazioni.

#### **Microscopia confocale:**

Eseguite come descritto nelle relazioni precedenti, con lo strumento Leica TCS SP2 e relativo Leica Confocal Software.

#### **Microscopia a fluorescenza:**

Microscopio Zeiss HBO 50/AC, software Image-Pro Plus 5.1.

#### **Scatter:**

Cellule MDCKpincos e pincos/Dgk $\alpha$ -KD sono state piastrate alla concentrazione di 1000 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Lo scatter è stato indotto con un trattamento overnight in terreno al 10% FBS, in presenza degli stimoli indicati. Le cellule sono state quindi osservate al microscopio a fluorescenza e in campo chiaro con un obiettivo 20x e fotografate. Sono mostrati campi rappresentativi.

#### **Immunoprecipitazioni anti-Myc-Dgk $\alpha$ :**

Le cellule 293T trasfettate, dopo una notte in assenza di siero, sono state trattate e quindi lisate in Tampone di lisi (HEPES 25mM pH8, NaCl 150mM, NP40 1%, EDTA 5mM, EGTA 2mM, ZnCl<sub>2</sub> 1mM, NaF 50mM, glicerolo 10%) addizionato a fresco con Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM finale e un mix di inibitori delle proteasi contenente AEBSF, EDTA, Bestatin E-64, Leupeptina ed Aprotinina (Sigma) secondo le indicazioni della casa produttrice. Prima della denaturazione in Laemli Buffer, gli immunoprecipitati sono stati lavati 3 volte

con il medesimo tampone della lisi. Immunoprecipitati e lisati totali sono stati separati mediante SDS-PAGE con gel al 12%.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Topham MK, Prescott SM. **Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions.** J Biol Chem. 1999 Apr 23;274(17):11447-50. Review.
2. Imai S, Kai M, Yasuda S, Kanoh H, Sakane F. **Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGK kappa.** J Biol Chem. 2005 Dec 2;280(48):39870-81.
3. Topham MK. **Signaling roles of diacylglycerol kinases.** J Cell Biochem. 2006 Feb 15;97(3):474-84. Review.
4. Luo B, Prescott SM, Topham MK. **Association of diacylglycerol kinase zeta with protein kinase C alpha: spatial regulation of diacylglycerol signaling.** J Cell Biol. 2003 Mar 17;160(6):929-37.
5. Wim J. van Blitterswijk, Brahim Houssa. **Properties and functions of diacylglycerol kinases.** Cellular Signalling Volume 12, Issues 9-10 , October 2000, Pages 595-605
6. Sanjuan MA, Pradet-Balade B, Jones DR, Martinez-A C, Stone JC, Garcia-Sanz JA, Merida I. **T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation.** J Immunol. 2003 Mar 15;170(6):2877-83.
7. Zhong XP, Hainey EA, Olenchock BA, Jordan MS, Maltzman JS, Nichols KE, Shen H, Koretzky GA. **Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase zeta deficiency.** Nat Immunol. 2003 Sep;4(9):882-90.
8. Olenchock BA, Guo R, Silverman MA, Wu JN, Carpenter JH, Koretzky GA, Zhong XP. **Impaired degranulation but enhanced cytokine production after Fc epsilonRI stimulation of diacylglycerol kinase zeta-deficient mast cells.** J Exp Med. 2006 Jun 12;203(6):1471-80.
9. Flores I, Jones DR, Cipres A, Diaz-Flores E, Sanjuan MA, Merida I. **Diacylglycerol kinase inhibition prevents IL-2-induced G1 to S transition through a phosphatidylinositol-3 kinase-independent mechanism.** J Immunol. 1999 Jul 15;163(2):708-14.
10. Bacchiocchi R, Baldanzi G, Carbonari D, Capomagi C, Colombo E, van Blitterswijk WJ, Graziani A, Fazioli F. **Activation of alpha-Diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase.** Blood (2005). 106(6):2175-82.
11. Cutrupi S, Baldanzi G, Gramaglia D, Maffe A, Schaap D, Giraudo E, van Blitterswijk W, Bussolino F, Comoglio PM, Graziani A. **Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility.** EMBO J. 2000 Sep 1;19(17):4614-22.
12. Baldanzi G, Mitola S, Cutrupi S, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Sinigaglia F, Bussolino F, Graziani A. **Activation of diacylglycerol kinase alpha is required**

- for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro.* Oncogene. 2004 Jun 17;23(28):4828-38.
13. Boyer B, Vallés AM, Edme N. **Induction and regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition.** Biochemical Pharmacology (2000) 60: 1091-1099.
  14. Ridley A, Comoglio PM, Hall A. **Regulation of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells.** Molecular and Cellular Biology (1995) 15(2): 1110-1122.
  15. Lamorte L., Royal I, Naujokas M. and Park M. **Crk Adapter Proteins Promote an Epithelial– Mesenchymal-like Transition and Are Required for HGF-mediated Cell Spreading and Breakdown of Epithelial Adherens Junctions.** Mol. Biol. Cell (2002) 13: 1449–1461
  16. Lamorte L, Rodrigues S, Sangwan V, Turner CE, Park M. **Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/ $\beta$ -PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts.** Molecular Biology of the Cell (2003) 14: 2818-2831.
  17. Burridge K, Wennerberg K. **Rho and Rac take center stage.** Cell (2004) 116: 167-179.
  18. Zondag GC, Evers EE, ten Klooster JP, Janssen L, van der Kammen RA, Collard JG. **Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition.** J Cell Biol. 2000 May 15;149(4):775-82.
  19. Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M. **Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation.** Mol Biol Cell. 2000 May;11(5):1709-25.
  20. Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT. **Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac.** FEBS Lett. 2003 Jul 3;546(1):93-7.
  21. Kurokawa K, Matsuda M. **Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling.** Molecular Biology of the Cell (2005) 16: 4294-4303.
  22. Del Pozo MA, Kiosses WB, Alderson NB, Meller N, Hahn KM, Schwartz MA. **Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI.** Nature Cell Biology (2002) 4: 232-239.
  23. Mazie AR, Spix JK, Block ER, Achebe HB, Klarlund JK. **Epithelial cell motility is triggered by activation of the EGF receptor through phosphatidic acid signaling.** J Cell Sci. 2006 Apr 15;119(Pt 8):1645-54. Epub 2006 Mar 28.
  24. Topham MK, Prescott SM **Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism.** J Cell Biol. 2001 Mar 19;152(6):1135-43.
  25. Regier DS, Higbee J, Lund KM, Sakane F, Prescott SM, Topham MK. **Diacylglycerol kinase iota regulates Ras guanyl-releasing protein 3 and inhibits Rap1 signaling.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 24;102(21):7595-600.
  26. Jones DR, Sanjuan MA, Stone JC, Merida I. **Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase alpha induces sustained signaling through RasGRP.** FASEB J. 2002 Apr;16(6):595-7.
  27. Sanjuan MA, Pradet-Balade B, Jones DR, Martinez-A C, Stone JC, Garcia-Sanz JA, Merida I. **T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation.** J Immunol. 2003 Mar 15;170(6):2877-83.

28. Houssa B, de Widt J, Kranenburg O, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. ***Diacylglycerol kinase theta binds to and is negatively regulated by active RhoA.*** J Biol Chem. 1999 Mar 12;274(11):6820-2.
29. McMullan R, Hiley E, Morrison P, Nurrish SJ. ***Rho is a presynaptic activator of neurotransmitter release at pre-existing synapses in C. elegans.*** Genes Dev. 2006 Jan 1;20(1):65-76.
30. Tsushima S, Kai M, Yamada K, Imai S, Houkin K, Kanoh H, Sakane F. ***Diacylglycerol kinase gamma serves as an upstream suppressor of Rac1 and lamellipodium formation.*** J Biol Chem. 2004 Jul 2;279(27):28603-13. Epub 2004 Apr 21.
31. Yakubchik Y, Abramovici H, Maillet JC, Daher E, Obagi C, Parks RJ, Topham MK, Gee SH. ***Regulation of neurite outgrowth in N1E-115 cells through PDZ-mediated recruitment of diacylglycerol kinase zeta.*** Mol Cell Biol. 2005 Aug;25(16):7289-302.
32. Chuang T-H, Bohl BP, Bokoch GM. ***Biologically active lipids are regulator of Rac.GDI complexation.*** The Journal of Biological Chemistry (1993) 268(35): 26206-26211.
33. Wang H, Yang C, Leskow FC, Sun J, Canagarajah B, Hurley JH, Kazanietz MG. ***Phospholipase Cgamma/diacylglycerol-dependent activation of beta2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling.*** EMBO J. 2006 May 17;25(10):2062-74. Epub 2006 Apr 20.

## 6. PRODUZIONE SCIENTIFICA

### Articoli pubblicati:

De Gobbi M, Caruso R, Daraio F, **Chianale F**, Pinto RM, Longo F, Piga A, Camaschella C. "Diagnosis of Juvenile hemochromatosis in an 11-year-old child combining genetic analysis and non-invasive liver iron quantitation" Eur J. Pediatr. **2003** Feb. 162(2):96-9.

### Articoli sottomessi:

Baldanzi G, Cutrupi S, **Chianale F**, Gnocchi VF, E Loggia, Notario M, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Parolini O, Bussolino F, Sinigaglia F and Graziani A. "Diacylglycerol kinase- $\alpha$  phosphorylation by src on Tyr 335 is required for activation, membrane recruitment and HGF induced cell motility"

Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Traini S, Porporato PE, Tauli R, Baldanzi G, Cutrupi S, **Chianale F**, Fubini A, Sinigaglia F, Ponzetto C, Crepaldi T, Graziani A. "Ghrelin and Des-acyl Ghrelin promote differentiation and fusion of c2c12 skeletal muscle cells"

### Articoli in preparazione:

Cutrupi S\*, **Chianale F\***, Porporato P, Baldanzi G, Gnocchi V, Filigheddu N, Santoro M, Sinigaglia F and Graziani A. "Dkg- $\alpha$  is involved in HGF and v-Src -mediated epithelial mesenchymal transition".

\* **Condivisione di primo nome**

### Comunicazioni a congressi AA 2005-2006:

- SIB (Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare), Convegno annuale della sezione Lombardo-Ligure-Piemontese – 20 maggio 2005, Novara

*DIACYLGLYCEROL KINASE-ALPHA REGULATES HGF-INDUCED EPITHELIAL CELL MOTILITY BY ACTING ON FOCAL COMPLEXES ASSEMBLY AND RAC1 LOCALIZATION AND ACTIVATION.*

**F. Chianale**, S. Cutrupi, C. Deantonio, E. Rainero, P. Porporato, G. Baldanzi, G. Brignoli, V. Gnocchi, N. Filigheddu and A. Graziani

- ABCD 2005 - Certosa di Pontignano (Siena)

*DIACYLGLYCEROL KINASE-ALPHA REGULATES HGF-INDUCED EPITHELIAL CELL MOTILITY BY ACTING ON FOCAL COMPLEXES ASSEMBLY AND RAC1 LOCALIZATION AND ACTIVATION.*

**F. Chianale**, S. Cutrupi, C. Deantonio, P. Porporato, G. Baldanzi, G. Brignoli, V. Gnocchi, N. Filigheddu and A. Graziani

- ABCD 2004 - Hotel Farnese, Roma:

*HGF- AND V-SRC-INDUCED ACTIVATION OF DIACYLGLYCEROL KINASE- $\alpha$  ARE REQUIRED FOR EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION.*

Santina Cutrupi, **Federica Chianale**, Paola Mirabelli, Gianluca Baldanzi, Nicoletta Filigheddu, Viola Gnocchi, Andrea Graziani

### **Altri abstracts e posters presentati a congressi e meetings:**

- Congresso SIB 2006 – Riccone, 28-30 settembre 2006.

*DIACYLGLYCEROL KINASE ALPHA REGULATES RAC ACTIVATION AND HGF INVASION.*

G. Baldanzi, C. Santina, **F. Chianale**, P. Porporato, V. Gnocchi, G. Brignoli, F. Sinigaglia, A. Graziani, S. Traini, N. Filigheddu.

- Congresso Nazionale delle Biotecnologie CNB9 – Torino, 4-8 settembre 2006

*DGK-ALPHA REGULATES HGF-INDUCED CELL MOTILITY THROUGH RAC.*

**Chianale Federica**, Deantonio Cecilia, Baldanzi Gianluca, Gaggianesi Miriam, Santina Cutrupi, Gnocchi Viola, Porporato Paolo, Traini Sara, Andrea Graziani.

- Congresso Nazionale delle Biotecnologie CNB9 – Torino, 4-8 settembre 2006

*GHRELIN INDUCES DIFFERENTIATION AND FUSION OF C2C12 MYOBLASTS AND PROTECTS MYOTUBES FROM ATRPPHY.*

Gnocchi VF, Filigheddu N, Coscia M, Badà L, Sottini F, Traini S, Porporato P, **Chianale F**, Baldanzi G, Taulli R, Crepaldi T, Sinigaglia F, Graziani A. i

- Gordon Conference “Growth Factor Signaling” – Connecticut College, New London, CT (USA), 16-21 luglio 2006.

*SRC-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF DGK $\alpha$  ON TYROSINE 335 IS REQUIRED FOR ITS ACTIVATION, MEMBRANE RECRUITMENT AND HGF-INDUCED CELL MOTILITY.*

Baldanzi G, **Chianale F**, Porporato P, Rainero E, Traini S, Deantonio C, Gaggianesi M, Gnocchi VF, Graziani A.

- BRESOM Brest Cancer and Metastasis Meeting – Institute Curie, Paris, France, 22-24 giugno 2006.

*ACTIVATION AND MEMBRANE RECRUITMENT OF  $\alpha$ DGK ARE MEDIATED BY SRC-DEPENDENT PHOSPHORYLATION OF TYROSINE 335 AND ARE REQUIRED FOR HGF-INDUCED RAC ACTIVATION AND CELL MIGRATION.*

Porporato P, Baldanzi G, Cutrupi S, **Chianale F**, Graziani A.

- Proteine 2006 – Novara, 1-3 giugno 2006

*ALPHA-DIACYLGLYCEROL KINASE IN TYROSINE KINASE SIGNALING.*

A. Graziani, **F. Chianale**, P. Porporato, G. Brignoli, S. Traini, V. Gnocchi, N. Filigheddu, S. Cutrupi, G. Baldanzi.

- Proteine 2006 – Novara, 1-3 giugno 2006.

*DGK- $\alpha$  REGULATES HGF AND v-SRC –INDUCED CELL MOTILITY THROUGH PAXILLIN AND RAC.*

**F. Chianale**, S. Cutrupi, E. Rainero, C. Deantonio, S. Sampietro, P. Porporato, V. Gnocchi, S. Traini, G. Brignoli, A. Graziani.

- Proteine 2006 – Novara, 1-3 giugno 2006.

*DGK- $\alpha$  PHOSPHORYLATION BY SRC IS REQUIRED FOR ACTIVATION, MEMBRANE RECRUITMENT AND HGF INDUCED CELL MOTILITY.*

G. Baldanzi, D. Pagnozzi, S. Cutrupi, **F. Chianale**, V. Gnocchi, N. Filigheddu, O. Parolini, F. Sinigaglia, P. Pucci, A. Graziani

- Proteine 2006 – Novara, 1-3 giugno 2006.

*GHRELIN ACTIVITY ON CARDIO-VASCULAR AND MUSCULAR SYSTEMS: AN IN VITRO STUDY AND IN VIVO PERSPECTIVES.*

V. Gnocchi, N. Filigheddu, L. Badà, F. Sottini, S. Traini, **F. Chianale**, G. Brignoli, S. Cutrupi, G. Baldanzi, P. Porporato, R. Taulli, C. Ponzetto, T. Crepaldi, A. Graziani.

- FEBS Special Meeting – Cellular Signaling - Dubrovnik (Croatia), May 26 - June 1 2006

*ShRNA TO STUDY THE ROLE OF DIACYLGLYCEROL KINASE ALPHA IN TUMORIGENESIS.*

P. Porporato, **F. Chianale**, V. Gnocchi, G. Baldanzi, S. Cutrupi, G. Brignoli, S. Traini and A. Graziani.

## **7. ELENCO SEMINARI SEGUITI NEL CORSO DEL IV ANNO DI DOTTORATO**

- 18-10-2005  
"La genetica delle sordità" – Prof. P. Gasparini
- 18-11-2005  
"Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits" – Dott. D. Cotella
- 23-11-2005  
"HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications " – Prof. L.E. Adinfi
- 25-11-2005  
"Mechanisms of transcriptional regulation and disease" – Prof. R. Tjian
- 19-01-2006  
"Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation" – Prof. M. Grano
- 13-02-2006  
"New perspectives in metabotropic glutamate receptors neurobiology" – Prof. F. Nicoletti
- 15-02-2006  
"Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico" – Prof. D. Sblattero
- 20-02-2006  
"Tecniche di biologia e genetica molecolare nella diagnostica del carcinoma del colon" – Dott. D. Furlan
- 13-03-2006  
"Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia" – Prof. A. Follenzi
- 20-03-2006  
"The natural course of preclinical type 1 diabetes" – Prof. M. Knip
- 23-03-2006  
"La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa Sub Sahariana. L'esperienza del programma DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDA and Malnutrition)" – Dott. S. Ceffa
- 30-03-2006

“Analisi spettrale dell’intervallo RR dell’elettrocardiogramma. Un moderno strumento per l’analisi digitale dell’attività elettrica cardiaca” – Dott. A. Brunori

- 06-04-2006  
“Aspetti immunogenetici e terapeutici della hairy cell leukemia” – Prof. F. Forconi
- 03-05-2006  
“Impatto delle biotecnologie sulle strategie di impresa nel settore della tutela della salute” – Dott. C. Jommi
- 04-05-2006  
“Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale” – Dott. L. Mutti
- 18-05-2006  
“L’epatite autoimmune” - Prof. M. Lenzi
- 30-05-2006  
“Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni” – Prof. M. Lavitrano
- 15-06-2006  
“Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptive cardiac remodeling to pressure overload” – Prof. G. Tarone
- 19-06-2006  
“Ruolo eziologico dei papilloma virus umani (HPV) nello sviluppo di lesioni neoplastiche nel distretto genitale” – Prof. N. Surico, Prof. M. Gariglio, Prof. R. Boldorini, Prof. M. Sideri
- 27-06-2006  
“Osteointegrazione e superfici implantari” – Prof. L. Rimondini
- 05-07-2006  
“DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccines design” – Dott. R. Grifantini