

# Università degli Studi del Piemonte Orientale “A. Avogadro”

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Scienze Mediche

*XX Ciclo di Dottorato in “Medicina Molecolare”*

## **Studio sul ruolo di $\alpha$ DGK nella progressione tumorale *in vitro* ed *in vivo***

Relazione del secondo anno di:

Paolo Ettore Porporato

Graziani

Relatore:

Prof. Andrea

## **Introduzione**

### **Le diacilglicerolo cinasi**

La diacilglicerolo cinasi (DGK) fosforila il diacilglicerolo (DG) per generare acido fosfatidico (PA). Le DGK costituiscono una famiglia di nove isoenzimi caratterizzati da un dominio catalitico altamente conservato e da almeno due domini ricchi in cisteina omologhi a PKC e Raf (Topham and Prescott, 1998). Ciascuna isoforma contiene domini regolatori specifici: all'N-terminale  $\alpha$ DGK contiene due domini EF-hand che legano il calcio. Tutte le DGK sono enzimi citosolici o nucleari che in seguito ad attivazione sono reclutati alla membrana dove accedono al proprio substrato. Metabolizzando DG e generando PA, entrambi secondi messaggeri, gli enzimi DGK possono svolgere un ruolo importante nella trasduzione del segnale sebbene tale ruolo rimanga da essere identificato. Nei linfociti T  $\alpha$ DGK è attivata dalla citochina IL-2 ed è necessaria per l'entrata in fase S del ciclo cellulare e nell'espressione di differenti geni come myc, fos e ciclina D3 (Flores et al., 1996). In questo laboratorio abbiamo dimostrato che  $\alpha$ DGK è attivata da HGF, mostrando per la prima volta il suo ruolo nella trasduzione del segnale di un recettore tirosina cinasi. Inoltre abbiamo dimostrato che  $\alpha$ DGK è necessaria nella cascata di attivazione di HGF utilizzando un inibitore specifico, R59949 e un mutante cataliticamente inattivo, che funziona come dominante negativo. L'inibizione della  $\alpha$ DGK blocca la migrazione in cellule endoteliali, la proliferazione cellulare, lo scatter e la tubulogenesi in cellule epiteliali in seguito a trattamento con HGF (Cutrupi et al., 2000). Recentemente, inoltre, è anche emerso che la presenza di  $\alpha$ DGK è fondamentale per la mediazione di stimoli proliferativi e di angiogenesi indotti da VEGF (Baldanzi et al. 2004).

Allo stesso modo è emerso che la proteina di fusione NPM/ALK, dove la cinasi alk risulta costitutivamente attiva, regola positivamente l'attività lipide cinasica di DGK (Bacchiocchi R et al. 2005).

La progressione metastatica dei tumori derivati da epitelio richiede la trasformazione delle cellule epiteliali non invasive e polarizzate in cellule mesenchimali invasive non polarizzate, che rompono la membrana basale e invadono la matrice interstiziale. Il meccanismo pro-invasivo delle cellule epiteliali è indotto dalla stimolazione con HGF e dall'espressione di v-Src. Infatti le forme costitutivamente attive di HGF-R e di v-Src sono state trovate nei carcinomi epiteliali. HGF e v-Src inducono un fenotipo invasivo attraverso la dissociazione delle caderine, che mediano le interazioni cellula-cellula, la formazione dei lamellipodi e il rimodellamento dell'actina corticale e della adesioni focali (Frame, 2002; Furge *et al.*, 2000). L'attivazione di PI3-kinase, di Ras e Rac, come anche l'attivazione di Src e FAK sono necessarie per lo scatter indotto da HGF (Furge *et al.*, 2000). L'inibizione della alphaDGK non influenza la fosforilazione del recettore HGF-R, che è regolata negativamente dall'attivazione di PKC (Furge *et al.*, 2000), indicando probabilmente che gli effetti del segnale di HGF osservati in seguito ad inibizione di alphaDGK dipendono da un aumento dei livelli di DG. Inoltre gli esteri del forbolo, che stimolano il segnale mediato da DG, inducono piuttosto che inibire lo scatter delle MDCK (Nishiyama et al., 1994).

## **RNA interference.**

Con questa espressione si indica un processo fisiologico mediante il quale la funzione di uno specifico gene viene bloccata a livello post-trascrizionale dovuto alla degradazione dell'RNA messaggero corrispondente, in seguito al riconoscimento di una sequenza specifica per mezzo di piccole sequenze di RNA (siRNAs: short interfering RNAs).

Recentemente è stata identificata una nuova classe di enzimi, appartenenti alla famiglia di DICER. Questi enzimi, hanno la capacità di riconoscere le sequenze di RNA a doppio filamento e tagliarle in frammenti di 19-21bp. Questi frammenti di RNA (short RNAs) sono riconosciuti ed incorporati in un complesso proteico denominato RISC. Questo complesso successivamente si occupa di disaccoppiare i due filamenti di RNA e di mediare un processo di degradazione sequenza specifica del mRNA bersaglio, utilizzando uno dei due frammenti short RNA singolo filamento.

Il fenomeno dell'interferenza da RNA (RNA interference; RNAi) è stato inizialmente scoperto nel nematode *Caenorhabditis elegans* ed in alcuni tipi di fiore in cui l'introduzione

di una molecola di RNA a doppio filamento (dsRNA) è in grado di indurre una potente e specifica degradazione dell'RNA messaggero contenente la stessa sequenza nucleotidica del dsRNA (Fire *et al.*, 1998).

Successivamente questo meccanismo è stato riscontrato essere efficiente anche nei mammiferi dove, infatti, è presente tutto il corredo enzimatico per poter attuare l'interferenza da RNA (Hannon, 2002).

Nella pratica di laboratorio l'RNAi può essere attuata in tre diversi modi:

- Il primo di tutti è la trasfezione di brevi frammenti di 21bp all'interno della cellula disegnati contro una sequenza bersaglio, il problema di questo sistema è che non tutte le sequenze dirette contro l'mRNA target risultano poi efficaci poiché spesso non vengono riconosciute dal complesso RISC.
- Il secondo consiste invece nella trasfezione di lunghi dsRNA che vengono successivamente trasformati in siRNA da DICER; sebbene questo sistema presenti un'efficienza più elevata, non è molto utilizzato nella pratica di laboratorio, in quanto non è possibile determinare la sequenza degli siRNA derivanti e quindi è impossibile escludere la presenza di eventuali regolazioni di altri mRNA "off-target".
- Il terzo, infine, è un metodo che coinvolge l'utilizzo di vettori recanti un promotore della trascrizione degli short RNAs: revemente, in esso si inserisce una sequenza che solo parzialmente è diretta contro l'mRNA bersaglio, il resto ha la funzione di produrre una struttura secondaria della sequenza a forma di forcina (hairpin), dovuta all'appaiamento della parte centrale della sequenza, questa struttura viene quindi riconosciuta da DICER che lo porta a maturazione in siRNA. Sebbene questo metodo sia il più difficile da mettere a punto, è anche l'unico che permette un abbattimento costitutivo dell'espressione genica.

## **Scopo e prospettive future**

Scopo del mio lavoro è quello di analizzare il ruolo della diacilglicerolo cinasi alpha (alphaDGK) in modelli di progressione tumorale.

A tal fine il mio progetto prevede una prima fase di caratterizzazione "in vitro", per valutare alcuni parametri critici della crescita tumorale in presenza/assenza di alphaDGK attiva come il tasso proliferativo, la crescita in assenza di ancoraggio, la capacità invasiva, quella chemiotattica e la resistenza a stimoli apoptotici indotti.

Successivamente il mio lavoro sarà volto a caratterizzare il ruolo della alphaDGK nella progressione tumorale "in vivo", per fare questo sarà necessario inoculare in topi

immunodepressi una o più linee cellulari esprimenti o meno alphaDGK WT, o determinate forme mutate, per poter poi andare a caratterizzare a livello istologico il potenziale tumorale delle varie cellule.

Per ottenere una forte riduzione dell'espressione di alphaDGK il mio progetto prevede di utilizzare la tecnologia dell'RNA interference mediata da vettori lentivirali con i quali è possibile ottenere una soppressione stabile del trascritto di interesse.

Partendo dalla sequenza interferente più efficace, individuata nell'anno precedente, ho prodotto un lentivirus con cui ho infettato tre diverse linee cellulari d'origine tumorale: GTL16 (carcinoma gastrico) , MDA-MB-435 e MDA-MB-231 (carcinoma duttale mammario).

In seguito, una volta ottenuta una linea infettata con il lentivirus, ho valutato l'effettiva riduzione dell'espressione di alphaDGK in western ed in Real-Time PCR, quantificata la riduzione dell'espressione di alphaDGK ho condotto la caratterizzazione fenotipica di queste linee, in particolare il potenziale proliferativo di queste cellule, il loro livello di invasività, la capacità di fare tubulogenesi, di aderire a varie matrici cellulari, di crescere in assenza di ancoraggio.

Infine ho disegnato un vettore di "rescue", ossia di recupero del fenotipo, per valutare la specificità della mia sequenza interferente.

Successivamente dovrò studiare il potenziale tumorale di queste cellule in modelli murini immunodepressi.

## **Risultati e commento**

### **Soft agar**

Le cellule GTL-16 presentano la caratteristica di formare colonie una volta messe a crescere in un terreno solido in un saggio di soft-agar, questa è una caratteristica tipica di molte cellule epiteliali trasformate.

Per valutare se alphaDGK può essere implicata nella trasformazione tumorale ho effettuato un saggio di crescita in soft-agar in presenza ed assenza dell'inibitore specifico della classe I delle DGK.

Dopo 20 giorni di crescita in soft-agar è emerso che le cellule trattate con l'inibitore delle DGK classe I, perdono quasi totalmente la capacità di crescere in soft-agar già a concentrazioni molto basse come 1uM.

Utilizzando, invece, delle cellule recanti l'RNA interference contro alphaDGK le colonie si formano sebbene con un diametro minore, indicando che gli effetti prodotti dall'inibitore R59949 non sono totalmente dovuti all'inattivazione di alphaDGK, ma probabilmente imputabili all'inattivazione congiunta delle isoforme  $\beta$  e  $\gamma$ , oltre che ad eventuali aspecifici.

## **Produzione dei lentivirus ed infezione**

Dopo aver identificato la sequenza HsDGKaSh1 come la più efficiente ho clonato l'ho clonata in un vettore lentivirale pCCL.sin.PPT.hPGK.GFPWpre descritto nel lavoro di Follenzi et al, Blood 2000, questo vettore è un vettore di terza generazione caratterizzato dalla presenza della GFP oltre che dalla cassetta di espressione degli RNA interferenti clonata dal vettore pSUPER.

Con il vettore così prodotto ho nuovamente effettuato un esperimento di co-trasfezione su cellula MDCK con il vettore lentivirale ed un plasmide con Myc-Dgk. In seguito all'analisi in immunofluorescenza è emerso che le cellule trasfettate con il lentivirus recante la sequenza HsDGKaSh1, e quindi esprimenti la GFP, non esprimono alphaDGK umana, a differenza delle cellule trasfettate con il lentivirus con la sequenza Scrambled, disegnata in modo tale da non essere specifica per nessun mRNA, dove è presente un'alta espressione di DGK myc.

Con questo vettore chiamato Sh1D, esprimente la GFP e l'interference, ed uno vuoto recante solo la GFP, chiamato CTR, ho prodotto due differenti lentivirus tramite co-trasfezione dei tre vettori helper come descritto in Piva et al. (Blood 2005).

Con lo stock lentivirale così ottenuto ho infettato le seguenti linee: GTL16, MDA-MB-435 e MDA-MB-231. Tutte queste procedure sono state svolte nel laboratorio di biosicurezza P3 del CERMS di Torino.

Ogni nuova linea prodotta, in seguito ad ogni diversa infezione, (almeno quattro da ogni linea parentale) è stata analizzata al microscopio per l'espressione di GFP ed in western o in Real-Time per quantificare il calo di espressione dell' alphaDGK ed è stata utilizzata a fini sperimentali (per ogni combinazione vettore/linea parentale) solo la linea infettata con l'interference più efficiente.

Tutte le linee stabilite in seguito a queste procedure sono risultate avere un abbattimento dell'espressione di alphaDGK pressoché totale.

## **Saggio di proliferazione**

Per verificare il ruolo di Dgk $\alpha$  nella proliferazione cellulare è stato effettuato un saggio di incorporazione di bromodeossiuridina (BrdU).

Le cellule MDA-mb-435 CTR e Sh1d sono state piastrate in modo da avere 5000 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Il giorno seguente le cellule sono state osservate al microscopio per verificarne la corretta piastratura. Le cellule sono state mantenute in terreno DMEM privo di siero per 16 ore. In seguito sono stati effettuati i trattamenti, sempre in terreno privo di siero, con HGF ad una concentrazione di 50 ng/ml, R59949 ad una concentrazione 1  $\mu$ M e, infine, con la combinazione dei due. Come controllo è stato utilizzato terreno privo di siero addizionato con DMSO alla medesima diluizione di R59949, in quanto solvente quest'ultimo. Il giorno successivo è stata aggiunta la BrdU e dopo 16 ore le cellule sono state fissate e trattate con l'anticorpo specifico che la riconosce. Le cellule sono state quindi analizzate allo spettrofotometro.

Le cellule CTR presentano un aumento significativo della proliferazione, dopo trattamento con HGF, che non si riscontra nelle cellule Sh1d. Le cellule Sh1d non sono sensibili allo stimolo proliferativo ed il risultato dimostra il ruolo di Dgk $\alpha$  nella proliferazione di cellule tumorali indotta da HGF.

Cellule MDA-MB-231 sono state invece contate ad ogni passaggio ed, anche in questa linea cellulare, le cellule esprimenti l'interference per alphaDGK presentano un calo di 2/3 del tasso proliferativo.

## **Saggio di invasione in matrigel**

Al fine di valutare il potenziale invasivo delle cellule infettate con il lentivirus Sh1D , interferente per alphaDGK, cellule MDA-MB231 SH1 (infettate recanti shRNA) e MDA-MB-231 CTR sono state piastrate in pozzetti transwell porosi (8 $\mu$ M, BD) e trattate con e senza HGF50vg/ml.

Mentre nella linea di controllo questo trattamento induceva un aumento del potenziale invasivo pari a 3 volte fortemente significativo, lo stesso non induceva nessun aumento nelle cellule recanti l'interference.

## **Produzione del vettore *rescue***

È noto che ogni sequenza interferente può presentare degli effetti aspecifici non correlati alla sequenza bersaglio (off-target). Come controllo dell'effettiva specificità della sequenza interferente Sh1d è stato deciso di sviluppare un vettore salvataggio (*rescue*) utilizzando il sistema Quick-Change.

Nel vettore pDONOR, contenete la sequenza di Dgk $\alpha$  wilde-type, è stata inserita una mutazione di quattro nucleotidi nel sito di riconoscimento dell'mRNA da parte della sequenza interferente. La mutazione inserita è di tipo conservativo, volta ad evitare il riconoscimento del mRNA da parte della sequenza interferente senza causare mutazioni della sequenza aminoacidica. Per la mutazione sono stati utilizzati primers disegnati in modo da mantenere la cornice di lettura e contenenti le basi mutate.

Per verificare l'inserimento della mutazione, il vettore ottenuto è stato utilizzato per trasformare batteri competenti. I batteri sono stati piastrati in piastre con ampicillina in modo da selezionare solo i batteri trasformati: il vettore pDONOR, infatti, presenta il gene di resistenza a questo antibiotico. Il vettore pWhiteScript fornito dalla ditta costituisce il controllo dell'efficacia del processo di mutagenesi: batteri trasformati sono stati piastrati in una piastra di LB agar contenente IPTG e X-gal, sulla quale sono state osservate colonie blu a dimostrazione dell'avvenuta mutazione.

Le sequenze mutate sono state comunque fatte sequenziare dalla M-Medical di Milano.

## **Materiali e metodi**

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

Cellule MDCK (Madin-Darby Canine Kidney epithelial cells) sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). I terreni di coltura sono stati supplementati con 10% di FBS ed addizionati con L-glutammina ed una soluzione premiscelata di streptomycin, penicillina e anfotericina-B (Sigma), secondo le indicazioni della casa produttrice.

Le trasfezioni transiente sono state eseguite con Lipofectamine2000 Reagent (Invitrogen), secondo le indicazioni della casa produttrice.

### **Produzione vettori lentivirali**

La trasfezione transiente delle cellule 293T per la produzione dei vettori lentivirali è stata eseguita con il seguente protocollo: le cellule sono state piastrate nel numero di

$10^6$  in piastre di diametro di 10 cm; la mix di plasmidi è stata preparata aggiungendo  $3\mu$  g di pMD<sub>2</sub>VSVG,  $5\mu$ g di pMDLg/p RRE,  $2,5\mu$ g di pRSV-REV e  $10-15\mu$ g di pCCL.sin.PPT.hPGK.GFPWpre (gentilmente forniti dal dottor L. Naldini). La soluzione è stata portata a volume finale di  $450\mu$ l con 0,1XTE/dH<sub>2</sub>O volume 2:1. Sono stati aggiunti  $50\mu$ l di CaCl<sub>2</sub> 2.5M vortexando. Dopo 5 minuti a RT sono stati aggiunti  $500\mu$ l di HBS2x. Dopo un passaggio al vortex la soluzione è stata aggiunta alle cellule.

### **Osservazioni al microscopio confocale:**

Cellule MDCK sono state piastrate su vetrini in piastre da 24 pozzetti, coltivate fino ad un appropriato grado di confluenza e quindi eventualmente trasfettate.

In seguito al trattamento le cellule sono state lavate 2 volte in PBS e fissate con una soluzione in PBS di paraformaldeide al 3% e saccarosio al 4% per 5' a RT. Dopo 2 lavaggi con PBS, sono state permeabilizzate con tampone contenente 20mM HEPES pH7.4, 300 mM saccarosio, 50 mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100 per 5' a 4°C. Sono quindi stati eseguiti 3 lavaggi con PBS-0.2% BSA ed un'incubazione di 15' con PBS-2% BSA a RT.  $15\mu$ l di soluzione di anticorpo primario diluito 1:100 in PBS-2% BSA sono stati posti direttamente su ciascun vetrino in camera umida per 30' e l'anticorpo in eccesso è stato lavato via con 3 lavaggi con PBS-0.2 % BSA. Prima della decorazione con l'anticorpo secondario è stata eseguita un'ulteriore incubazione con PBS-2% BSA. L'anticorpo secondario marcato con fluoroforo (solitamente 1:30 in PBS-2% BSA) insieme con la falloidina fluoresceinata (solitamente 1:100 in PBS-2% BSA), sono stati aggiunti direttamente sui vetrini ( $15\mu$ l di soluzione per vetrino) in camera umidificata per 30' e l'eccesso di anticorpo è stato eliminato con 3 lavaggi in PBS-0.2% BSA. I vetrini sono stati quindi sciacquati in acqua milliQ e montati su supporti per l'osservazione al microscopio con Mowiol (20% Mowiol 4-88 in PBS 1X pH 7.4) lasciato polimerizzare. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale Leica DM IRE2 e relativo Leica Confocal Software mediante la scansione di singoli piani per tutta l'altezza della cellula, dal piano basale a quello apicale. Sono mostrate nella presentazione le immagini più rappresentative, solitamente riferite alla porzione basale della cellula stessa.

### **PCR (reazione di polimerizzazione a catena)**

Per le reazioni di PCR ho utilizzato la polimerasi Dynazyme EXT (finnzymes) dotata di attività proofreading seguendo le istruzioni del distributore.

I primer utilizzati sono uguali sia per la alphaDGK wt che per la forma miristilata e la loro sequenza è

MycalphaDGK FWpstI: atgcctgcagTTGTTGTCAAGCTTGAGGTGT

MycalphaDGK rev Sall: atgcctgcacTTCAGATGAGGCACTTCAATG

## **Sequenze per l'interference**

Per clonare le Sh all'interno del pSUPER ho ordinato gli inserti come primers (Sigma) purificati per HPLC con le seguenti sequenze recanti anche le estremità "sticky" HINDIII e BglII:

Dgkalpha homo 1 FORWARD

**5'GATCCCCGGTCAGTGATGTCCTAAAGTTCAAGAGACTTTAGGACATCACTGACCTTTTTGGAAA**

Dgkalpha homo 1 reverse

**5'AGCTTTTCCAAAAAGGTCAGTGATGTCCTAAAGTCTCTTGAACCTTTAGGACATCACTGACCGGG**

Dgkalpha homo 2 FORWARD

**5'GATCCCCGGATGGCGAGATGGCTAAATTCAAGAGATTTAGCCATCTCGCCATCCTTTTTGGAAA**

Dgkalpha homo 2 reverse

**5'AGCTTTTCCAAAAAGGATGGCGAGATGGCTAAATCTCTTGAATTTAGCCATCTCGCCATCCGGG**

Dgkalpha homo 3 FORWARD

**5'GATCCCCGGATTTAGAGATGAGTAAATTCAAGAGATTTACTCATCTCTAAATCCTTTTTGGAAA**

Dgkalpha homo 3 reverse

**5'AGCTTTTCCAAAAAGGATTTAGAGATGAGTAAATCTCTTGAATTTACTCATCTCTAAATCCGGG**

scrambled FORWARD

5'GATCCCC

**AAGCTAGATGATGGGGCGATTCAAGAGATCGCCCCATCATCTAGCTTTTTTTTG  
GAAA**

scrambled reverse

**5'AGCTTTTCCAAAAAAGCTAGATGATGGGGCGATCTCTTGAATCGCCCCATC  
ATCTAGCTTGGG**

Gli oligo così ordinati sono stati annilati una volta dissolti in acqua per 10 minuti a 70°C dopo una denaturazione a 95°C per 5 min e successivamente lasciati raffreddare lentamente fino a 4°C.

I dimeri così ottenuti sono stati poi fosforilati ed inseriti in un vettore bidigerito e defosforilato.

## **Reazioni enzimatiche su acidi nucleici**

Tutti gli enzimi utilizzati nella manipolazione degli acidi nucleici utilizzati in questo anno (digestioni, ligasi e defosforilazioni e cinasi) sono stati acquistati dalla NEB e sono stati seguiti i protocolli forniti dal distributore.

## **Plasmidi e vettori utilizzati**

Gfp-DGK è stato prodotto a partire dal PMT2-MycDgk attraverso la tecnologia Gateway (Invitrogen).

pSUPER è gentilmente offerto dalla Prof.sa Carola Ponzetto dell'università di Torino.

Il pCCL.sin.PPT.hPGK.GFPWpre ed il pCCL.sin.poliA.CTE.minhCMV. eGFP.hPGKWpre sono stati gentilmente offerti dal Prof.Naldini dell'Università di Milano.

La cassetta di espressione del vettore pSUPER, composta dal promotore H1 e dalla sequenza interferente HsDGKaSh1, è stata subclonata nel vettore lentivirale pCCL.sin.PPT.hPGK.GFPWpre nel sito EcoRV ed XhoI tramite doppia digestione con questi enzimi di restrizione e successiva reazione di ligasi.

## **Saggio in soft agar**

Per il soft agar si è seguito il protocollo pubblicato in Nanni et al. Int J Cancer 2000, ma con la differenza che le cellule sono state coltivate con 1% di siero, per i trattamenti è stato aggiunto sopra il disco di agar una quantità tale di inibitore di alphaDGK da portare ad una concentrazione finale di 1µM

## **Saggio di invasione in matrigel**

Il saggio di invasione è stato effettuato con dei pozzetti ricoperti di matrigel (biocoat, BD) seguendo il protocollo standard: brevemente, le cellule sono state pilastrate 0,5X10E5 per pozzetto con terreno senza siero o con HGF 50vg/ml, incubate per 24h, fissate e colorate con Diff-Quick e successivamente contate.

## **Bibliografia**

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.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366 (2001).

Blesch Armin (2004), 'Lentiviral and MLV retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer', *Methods*, 33, pp.164-172.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*. 2,243-7 (2002).

Cutrupi S, Baldanzi G, Gramaglia D, Maffe A, Schaap D, Giraudo E, van Blitterswijk W, Bussolino F, Comoglio PM, Graziani A. (2000) Src-mediated activation of alpha-

diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *EMBO J.* **19**:4614-22.

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877-6888 (2001)

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811(1998).

Flores I, Casaseca T, Martinez-A C, Kanoh H, Merida I. (1996) 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.* **271**: 10334-40.

Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217-22.

Frame MC. (2002) Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta.* **21**. Review.

Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. (2000) Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene.* **20**. 5582-9. Review.

Goto, K., Fukuyama, M., and Kondo, H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 13042-13046

Hannon GJ. RNA interference. *Nature.* **418** 244-251 (2002)

Nanni P, Pupa SM, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Rossi I, Astolfi A, Ricci C, De Vecchi R, Invernizzi AM, Di Carlo E, Musiani P, Forni G, Menard S, Lollini PL. *Int J Cancer.* 2000 Jul 15;87(2):186-94.

Nishiyama T, Sasaki T, Takaishi K, Kato M, Yaku H, Araki K, Matsuura Y, Takai Y. (1994) rac p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in

hepatocyte growth factor- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol Cell Biol.* **14**:2447-56.

Piva, R., Chiarle, R., Manazza, A., Taulli, R., Simmons, W., Ambrogio, C., D'Escamard, V., Pellegrino, E., Ponzetto, C., Palestro, G., Inghirami, G. (2006), 'Ablation of oncogenic ALK is a viable therapeutic approach for Anaplastic Large Cell Lymphomas', *Blood*, 107, pp.689-697.

Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C., and Tanabe, T. (1990) *Nature* 344, 345-348

Topham MK, Prescott SM. (1999) Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem.* **274**:11447-50. Review.

## **Seminari seguiti durante questo anno di dottorato.**

1-2006/4-2006 Cours of English (of Irving Bell Colin)

12-09-2005 – “Caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion” – Dott. O. Parolini

13-09-2005 – “Functions of ribosomal protein S19: implications for Diamond Blackfan Anemia” Dott. S. Ellis

18-11-2005 – “Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits” Dott. Diego Cotella.

25-11-2005 –“ Mechanisms of Transcriptional Regulation and Disease” Prof. Robert Tjian.

19-1-2006 – “ Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation” Dott.ssa Maria Grano.

15-2-2006 – “Anticorpi ricombinanti:un potente tool biotecnologico” Prof. Daniele Sblattero.

13-3-2006 – “Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia”. Dott.ssa Antonia Follenzi.

20-3-2006 –“The natural course of preclinical type 1 diabetes” Prof. Mikael Knip.

6-4-2006 – “Aspetti immunogenici e terapeutici della hairy cell leukemia” Dott. Francesco Forconi.

04-5-2006 – “Il mesotelioma :un modello di terapia traslazionale” Dott. Luciano Mutti.

30-5-2006– “Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni” Dott.ssa Marialuisa Lavitrano.

15-6-2006 – “Melusin: a Stretch Sensor Molecule Controlling Adaptive Cardiac Remodeling to Pressure Overload” Prof. Guido Tarone.

19-6-2006 – “Ruolo eziologico dei papillomavirus umani (HPV) nello sviluppo di lesioni neoplastiche nel distretto genitale” Prof. N. Surico.

22-6-2006 – “Epatite ricorrente da HCV dopo trapianto di fegato” Prof. Pierluigi Toniutto.

27-6-2006– “Osteointegrazione e superfici implantari” Prof.ssa Lia Rimondini.

05-7-2006– “DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design”.  
Dott.ssa Renata Grifantini.

13-7-2006 – “L'approccio riabilitativo delle malattie cardiovascolari” Dr. Pantaleo Giannuzzi.

11-9-2006 – “The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis” Dr Prof. Dieter Brömme, Ph.D.

### **Corsi seguiti nel secondo anno di dottorato**

1-2006/4-2006 Cours of English (of Irving Bell Colin)

### **Partecipazioni a congressi nel secondo anno di dottorato**

FISV 2006- Riva del Garda, 28 settembre-1 ottobre.

Convegno Annuale della Sezione Ligure-Lombarda-Piemontese della società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare – Novara, 20 maggio 2005.

Proteine 2006 della società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare - Novara 1-3 Giugno 2006.

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

### **Elenco poster e comunicazioni a congressi nel secondo anno di dottorato.**

**Congresso SIB 2006 – Riccione, 28-30 settembre 2006.**

*"Diacylglycerol Kinase alpha regulates Rac activation and Hgf invasion".*

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

**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 P**, 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 atrophy".*

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.

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.

*"Alfa-Diacylglycerol in tyrosine kinase signaling".*

Andrea Graziani, Federica Chianale, **P Porporato**, Gabriele Brignoli, Sara Traini, Viola Gnocchi, Nicoletta Filigheddu, Santina Cutrupi, Gianluca Baldanzi.

Proteine 2006 Novara 1-3 giugno 2006.

*"Dgk- $\alpha$  regulates HGF and v-Src-induced cell motility through Paxillin and Rac"*.

Federica Chianale, Santina Cutrupi, Elena Rainero, Cecilia Deantonio, Sara Sanpietro, **P Porporato**, Viola Gnocchi, Sara Traini, Gabriele Brignoli, Andrea Graziani.

Proteine 2006 Novara 1-3 giugno 2006.

*"Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular systems: an in vitro study and in vivo perspectives"*.

Viola Gnocchi, Nicoletta Filigheddu, Laura Badà, Francesca Sottini, Sara Traini, Federica Chianale, Gabriele Brignoli, Santina Cutrupi, Gianluca Baldanzi, **P Porporato**, Riccardo Taulli, Carola Ponzetto, Tiziana Crepaldi and Andrea 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.

### **Elenco pubblicazioni in questo anno di dottorato**

Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M., Traini S, **Porporato PE**, Taulli 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"*.

*MCB submitted*