

**Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare  
*Ciclo XIX***

**Relazione 4° anno**

**TITOLO:**

**Ruolo di DGK- $\alpha$  nella trasformazione cellulare  
Ruolo di DGK- $\theta$  nel preconditionamento epatico**

Candidato: **Dott.** Gianluca Baldanzi

*Tutor:* Prof. A. Graziani

## **SEZIONE 1**

### **RISULTATI SCIENTIFICI**

Durante il quarto anno di dottorato la mia attività di ricerca si è articolata su due fronti:

1. **Lo studio del ruolo di Dgk- $\alpha$  nella trasformazione cellulare** (pag. 2) utilizzando due modelli cellulari:
  - a. Cellule carcinoma mammario MDA-MB-231 (in collaborazione con il gruppo di ricerca guidato dalla Dott.ssa N. Filigheddu)
  - b. Cellule derivate da sarcoma di Kaposi SLK (in collaborazione con il gruppo di ricerca guidato dalla Prof.ssa M. Prat)
2. **Lo studio del ruolo di Dgk- $\theta$  nel preconditionamento epatico** in collaborazione con il gruppo di ricerca guidato dalla Prof.ssa R. Carini (pag. 20)

# Ruolo di DGK- $\alpha$ nella trasformazione cellulare

## INTRODUZIONE

### Diacilglicerolo chinasi

Le diacilglicerolo chinasi (Dgk) sono una famiglia di enzimi che catalizzano la fosforilazione ATP-dipendente del diacilglicerolo (DAG) per formare acido fosfatidico (PA).

Il DAG è prevalentemente prodotto per idrolisi dei fosfatidilinositoli ed altri fosfolipidi ad opera delle fosfolipasi C (PLC). E' noto per reclutare alla membrana ed attivare le proteine chinasi C oltre a regolare l'attività di varie altre proteine tra cui RasGRP, chimaerine (Ras-GAP) e Unc-13. Il PA a sua volta è un regolatore di diverse proteine coinvolte nella trasduzione del segnale come la fosfatidilinositolo-4-fosfato-5-chinasi (PI4P-5K), la proteina chinasi C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ), Ras-GAP ed mTOR oltre ad essere un potente mitogeno in alcuni tipi cellulari. Le Dgk quindi regolando la conversione tra questi due secondi messaggeri sono il punto di controllo di due potenti vie di traduzione del segnale (Topham 2006).

Ad oggi sono state caratterizzate nell'uomo dieci isoforme di Dgk suddivise in cinque classi sulla base dei loro domini strutturali: tutte le isoforme possiedono un dominio chinamico verso il C-terminale preceduto da due domini C1 ricchi di cisteine analoghi a quelli delle PKC che potrebbero legare il DAG o mediare interazioni proteina-proteina. Le diverse isoforme di Dgk differiscono per localizzazione intracellulare e per i domini regolatori posti all'esterno N-terminale; ciò fa supporre che siano reclutate alla membrana e regolate in maniera specifica.

Dgk $\alpha$  è stata la prima Dgk caratterizzata, è abbondantemente espressa nei linfociti T ma è espressa anche nelle cellule epiteliali, endoteliali, fibroblasti ed oligodendrociti (Schaap et al.1990; Cutrupi et al 2000). Dgk $\alpha$  fa parte della classe I (composta da  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) caratterizzata dalla presenza al C-terminale di due domini EF-hand (fig. 9). Diversi meccanismi concorrono a regolare il reclutamento e l'attività di Dgk $\alpha$ : i) il legame con il calcio causa un cambiamento conformazionale rimuovendo un'interazione inibitoria tra l'estremo N-terminale ed il dominio catalitico, ii) è attivata da lipidi di membrana (fosfatidilserina, sfingosina, PI-3,4,5P<sub>3</sub>), iii) è fosforilata sulla tirosina 335 da Src e questo evento è richiesto per l'attivazione ed il reclutamento alla membrana plasmatica (Baldanzi et al. Oncogene 2007).

L'attività enzimatica di Dgk $\alpha$  è necessaria per la trasduzione del segnale di vari fattori di crescita e citochine, infatti la sua inibizione blocca: la proliferazione dei linfociti T indotta da IL-2 (Flores et

al. 1996); la migrazione di cellule endoteliali indotta da HGF (Cutrupi et al. 2000); la migrazione, la proliferazione e l'angiogenesi indotta da VEGF in cellule endoteliali (Baldanzi et al. 2004).

Recentemente si stanno accumulando evidenze che supportano un possibile ruolo di Dgk $\alpha$  nella trasformazione tumorale: i) Dgk $\alpha$  è necessaria per la proliferazione di linee cellulari derivate da linfomi anaplastici a grandi cellule esprimenti l'oncogene NPM-ALK (Bachocchi et al. 2005); ii) la sua inibizione promuove l'apoptosi indotta da TNF $\alpha$  in cellule di melanoma (Yanagisawa et al. 2007).

Va inoltre ricordato che una serie di studi in vitro e la caratterizzazione del topo Dgk $\alpha$ <sup>-/-</sup> dimostrano un ruolo chiave di Dgk $\alpha$  nel controllo dei livelli di DAG nel linfocita T, in questo sistema Dgk $\alpha$  inibisce l'attivazione indotta dal TCR e promuove uno stato di iporesponsività denominato anergia (Olenchock et al 2006).

Diminuendo i livelli di DAG ed aumentando quelli di PA Dgk $\alpha$  regola probabilmente numerosi effettori nei diversi sistemi biologici. Recentemente Yanagisawa et al. hanno riportato che Dgk $\alpha$  è necessaria per l'attivazione di NF-KB con effetti antiapoptotici. Nel laboratorio del Prof. A. Graziani si sta dimostrando che Dgk $\alpha$  trasloca alla membrana plasmatica in cellule stimulate con HGF ed è necessaria per l'attivazione ed il reclutamento di Rac1, una piccola proteina G coinvolta nel rimodellamento del citoscheletro e nella migrazione (Chianale et al. 2007).

## **Sarcoma di Kaposi**

Nel 1872 Moritz Kaposi descrisse per primo questa malattia come: "sarcoma idiopatico della pelle multi-pigmentato". Il sarcoma di Kaposi si manifesta oggi in quattro varianti cliniche: classico, endemico, iatrogeno ed associato all'AIDS (o epidemico). La forma classica è estremamente rara e si manifesta con prevalenza nella popolazione anziana dell'Europa orientale e meridionale. La forma endemica è stata riconosciuta per essere particolarmente frequente in regioni dell'Africa come lo Zambia dove rappresenta fino al 50% dei tumori diagnosticati. La forma iatrogena si sviluppa in pazienti sottoposti a terapia immunosoppressiva in seguito a trapianti con una frequenza stimata nello 0,5%. Infine è stato dimostrato un aumento considerevole della frequenza di questa malattia negli individui affetti da AIDS (molto più che a causa di immunodeficienze di diversa origine).

Il sarcoma di Kaposi si presenta in genere con un basso grado di malignità ed ad eccezione delle forme associate all'AIDS è poco aggressivo spesso regredendo spontaneamente come nel caso dell'interruzione della terapia immunosoppressiva o in seguito a terapia anti-retrovirale nelle forme associate ad HIV.

Il sarcoma di Kaposi si manifesta nel 90% dei casi nel derma con macchie di colore blu-porpora, ben demarcate e indolori in prevalenza nelle parti distali degli arti inferiori. Le macchie spesso si uniscono a formare placche e successivamente si trasformano in noduli di colore rosso-marrone, verrucosi e ipercheratotici che possono ulcerarsi e sanguinare. Si può ritrovare in sedi extracutanee, in particolare nei linfonodi, nei polmoni e nelle mucose orali e del tratto gastrointestinale dove raramente causa sintomi clinici (Francès et al. 1998; Iscovich et al. 2000). Le lesioni cutanee del SK sono ricche di vasi sanguigni irregolari con depositi di emosiderina e sono costituite da vari tipi cellulari, principalmente cellule fusate di origine endoteliale e fibroblasti, con infiltrati di cellule infiammatorie (linfociti, macrofagi e plasmacellule) ed eritrociti extravasati. Le cellule fusate sono state riconosciute di probabile origine endoteliale sulla base dei marcatori espressi tuttavia è dibattuto se derivino dall'endotelio linfatico o da quello vascolare (Di Bartoldo et al. 2004).

Un'ipotesi largamente accreditata sull'origine del sarcoma di Kaposi lo considera una iperproliferazione endoteliale indotta da fenomeni di tipo infiammatorio; a favore di questa tesi si deve notare la presenza di infiltrati di cellule infiammatorie e l'alta concentrazione nella lesione di citochine pro-angiogeniche tra cui bFGF, VEGF, HGF, IL-6.

In particolare HGF induce nelle cellule del sarcoma di Kaposi proliferazione ed una marcata neoangiogenesi. Le cellule fusate del sarcoma di Kaposi esprimono ad alti livelli il recettore HGFR e nelle lesioni è presente HGF il che suggerisce che esso possa prendere parte ad un circuito paracrino che influenza lo sviluppo del sarcoma di Kaposi (Naidu et al. 1993). Inoltre HGF fa assumere a cellule endoteliali in coltura la tipica morfologia delle cellule fusate del sarcoma, e promuove l'espressione di marcatori (XIIIa e VCAM-1) e chemochine (IL-1b, IL-6, IL-8) prodotte dalle cellule del sarcoma di Kaposi ma non dalle cellule endoteliali.

Ci sono opinioni divergenti riguardo al fatto che il sarcoma di Kaposi sia una neoplasia piuttosto che una iperplasia: alcuni gruppi di ricerca hanno trovato che le cellule fusate delle lesioni siano policlonali mentre altri hanno trovato cellule monoclonali negli stadi più avanzati della malattia il che suggerisce che la neoplasia possa essere un possibile stadio di sviluppo del sarcoma di Kaposi (Reitz et al. 1999).

Tra i vari fattori di rischio per l'insorgenza del sarcoma di Kaposi i più studiati sono l'infezione da HIV-1 e quella da HHV-8 o KSHV. Si è osservato che il ruolo di HIV-1 nello sviluppo del sarcoma di Kaposi non sia dovuto esclusivamente all'immunosoppressione che ne risulta, dato che si osserva il sarcoma di Kaposi in individui sieropositivi senza apprezzabili livelli di immunosoppressione (spesso indica l'insorgenza dell'infezione da HIV-1), e dato che la frequenza del sarcoma di Kaposi è decisamente più alta negli individui affetti da AIDS rispetto agli individui con immunosoppressione di origine diversa (Weiss et al. 2000).

Sembra che alla base della proprietà di HIV-1 di indurre il sarcoma di Kaposi ci sia Tat una proteina di 86-101 amminoacidi espressa e rilasciata dalle cellule infettate dal virus, che contiene all'estremità C-terminale un dominio RGD (ripetizioni del tripeptide arginina-glicina-aspartato) e un dominio basico. Il dominio RGD viene legato dalle integrine espresse dalle cellule e induce un segnale di adesione mentre la regione basica (simile ad altri fattori angiogenetici) compete con il bFGF per l'eparan-solfato esposto dall'endotelio, aumentando in questo modo la disponibilità di bFGF per le cellule e contemporaneamente Tat induce l'espressione di bFGF ad alti livelli aumentando quindi il segnale di questo fattore (Barillari et al. 1999). E' stato inoltre riportato che Tat attiva, tramite la sua regione basica, VEGFR-2 trasducendo un segnale angiogenetico. Infine Tat aumenta l'espressione di molecole di adesione cellulare (favorendo l'extravasazione dei leucociti); aumenta la produzione di diverse citochine e la proliferazione delle cellule endoteliali (Mitola et al. 2000).

Si ritiene inoltre che l'infezione di HIV-1 nei linfociti infiltrati porti al rilascio nella lesione di citochine pro-infiammatorie e di metallo-proteasi che degradando la matrice extracellulare, aumentino le proprietà invasive del SK (Prakash et al. 2000).

Nel sarcoma di Kaposi è stata per la prima volta individuata una sequenza di DNA omologa al genoma dei  $\gamma$ -herpes virus come l'herpes virus saimiri e l'Epstein-Barr virus che fu nominato herpes virus umano 8 (HHV-8) o herpes virus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV) (Chang et al. 1994). Il virus risulta presente virtualmente in tutte le lesioni del SK ma solo nell'1-5% delle cellule risulta trascrizionalmente attivo e inoltre non si rileva più dopo ripetuti passaggi in coltura delle cellule biotiche. Nonostante non sia stata dimostrata la sua capacità trasformante sono stati identificati diversi geni che possono essere coinvolti nella genesi del sarcoma di Kaposi (Neipel et al. 1999).

Come modello cellulare del sarcoma di Kaposi ho usato cellule SLK. Queste cellule sono state isolate da una biopsia di un sarcoma di Kaposi ottenuta da un uomo di 28 anni, HIV-negativo, in terapia immunosoppressiva con ciclosporina dopo aver subito un trapianto di rene (Siegal et al. 1990). Le cellule biotiche furono coltivate in terreno MEM-NEAA con 10% di FCS fino allo sviluppo in adesione di due linee cellulari: una di tipo fibroblastoide (che risultò non tumorigenica e scomparve dalla coltura successivamente) e una di tipo epitelioide (immortalizzata, con ridotta richiesta di fattori di crescita, indipendenza ad ancoraggio, tumorigenica, positiva a citomegalovirus ed ad virus allora ignoto). La linea cellulare ottenuta fu in seguito caratterizzata da Herndier et al. 1994 (SLK perché ottenuta da Sofia Levinton Kriss); presenta modeste aberrazioni cromosomiche, scarse atipie, un basso rapporto nucleo-citoplasma ed assenza di DNA di herpes virus o retrovirus. Analisi immunoistochimiche identificarono marcatori tipici delle cellule endoteliali: l'antigene

correlato al fattore VIII, il fattore di Von Willebrand, e l'antigene dell'anticorpo EN-4, oltre a CD68, uPAR e la lectina di *Ulex europaeus*. Fu riscontrata produzione di alti livelli di uPA e di PAI-1. Infine ad ulteriore indizio dell'origine endoteliale delle cellule si rilevò la presenza dei corpi di Weibel-Palade (tipici di arterie, vene, capillari ed endocardio ma assenti nell'endotelio linfatico).

### **Carcinoma mammario**

I carcinomi mammari possono essere classificati in base all'espressione del recettore degli estrogeni (ER); i carcinomi ER+ sono in genere responsivi a terapie con modulatori del ER come il tamoxifene e presentano una prognosi migliore dei carcinomi ER- che sono in genere più aggressivi e rappresentano il 30% dei carcinomi mammari invasivi (Osborne 1998, Sheikh et al. 1995). I tumori ER- sono irresponsivi alla terapia anti-estrogenica e sono spesso sovraesposti a stimoli autocrini/paracrini che ne favoriscono la progressione.

E' ben noto il ruolo di HGF e del recettore HGFR nella genesi e progressione tumorale ed in particolare nel favorire l'invasione della matrice e la formazione di metastasi. HGF promuove la proliferazione, dissociazione, migrazione ed invasione della matrice in molte varietà di tumori epiteliali oltre ad essere un potente fattore pro-angiogenico (Grant et al. 1993, Bussolino et al. 1992). La principale fonte fisiologica di HGF è rappresentata dai fibroblasti stromali, mentre molti carcinomi lo producono realizzando un loop autocrino (Fuchs et al. 1997, Lamszus et al. 1999). HGFR è stato rilevato in numerosi tumori tra cui quelli mammari ed il suo livello di espressione correla con la progressione tumorale ed una prognosi avversa, fino a studi che riportano che HGFR è un fattore prognostico indipendente nel carcinoma alla mammella (Beviglia et al. 1997, Camp et al. 1999, Ghossoub et al. 1998).

## SCOPO DEL LAVORO

Nel corso di questo anno di dottorato in uno studio guidato dalla Dott.ssa N. Filigheddu ho esplorato l'ipotesi che le diacilglicerolo cinasi siano potenziali bersagli farmacologici per il controllo del fenotipo trasformato di MDA-MB-231, un modello cellulare di carcinoma mammario negativo per il recettore degli estrogeni e quindi non responsivo alla terapia estrogenica e con prognosi sfavorevole. Queste cellule rispondono alla stimolazione con Hepatocyte growth factor (HGF) fattore di crescita che è stato ampiamente correlato con la proliferazione, migrazione ed invasività di vari carcinomi, inclusi quelli mammari (Meiners et al. 1998). Abbiamo quindi valutato se HGF potesse indurre l'attivazione delle DGK di classe I nelle MDA-MB-231. Inoltre abbiamo verificato se l'attività enzimatica delle DGK fosse necessaria per la crescita in assenza di ancoraggio e nell'invasione della matrice utilizzando l'inibitore R59949.

Considerando le crescenti evidenze che Dgk $\alpha$  sia coinvolta nell'acquisizione del fenotipo trasformato (Bachocchi et al. 2004) e il fondamentale ruolo che Dgk $\alpha$  svolge nell'endotelio attivato (Baldanzi et al. 2004) i laboratori del Prof. A. Graziani e della Prof.ssa M. Prat stanno valutando l'importanza di Dgk $\alpha$  nella biologia del sarcoma di Kaposi.

1. Valutare se l'attività enzimatica di Dgk $\alpha$  fosse richiesta nelle cellule SLK stimulate con HGF per:
  - a) la proliferazione,
  - b) il movimento
  - c) l'adesione.
2. Valutare gli effetti dell'inibizione di Dgk $\alpha$  sulla trasduzione del segnale di HGFR in cellule SLK. In particolare se l'attività enzimatica di Dgk $\alpha$  fosse richiesta per alcune vie di segnalazione molto ben caratterizzate quali le diverse cascate delle Mapk e Akt.

Per studiare l'importanza della Dgk $\alpha$  nelle cellule SLK ho utilizzato due strategie sperimentali:

1. ho trattato le cellule con l'inibitore R59949, un inibitore relativamente specifico per le Dgk di classe I già attivo sulla Dgk $\alpha$  alla concentrazione 1  $\mu$ M e su altre isoforme a concentrazioni maggiori;
2. ho utilizzato una linea di SLK stabilmente esprime alti livelli di un mutante cataliticamente inattivo che agisce da dominante negativo. Dgk $\alpha$ -KD presenta la mutazione G433D, che annulla l'attività catalitica dell'enzima. Studi precedenti hanno dimostrato che inibisce l'attivazione della Dgk $\alpha$  endogena probabilmente competendo per gli attivatori (Cutrupi et al. 2000).

Il fine ultimo di questi studi è valutare *in vitro* Dgk $\alpha$  quale possibile bersaglio farmacologico per il controllo del sarcoma di Kaposi.

## MATERIALI E METODI

### Colture cellulari

Le cellule SLK e MDA-MB-231 sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO, Invitrogen) con siero fetale bovino al 10% (FCS, GIBCO, Invitrogen) addizionato di antibiotici, antimicotici e un precursore stabile della glutammina (GlutaMAX, GIBCO, Invitrogen) e fatte crescere a 37 °C in atmosfera con 5% di CO<sub>2</sub>, satura di acqua.

Per studiare il ruolo biologico di Dgk $\alpha$  nel sarcoma di Kaposi sono state create due linee cellulari sovraesprimenti rispettivamente la Dgk $\alpha$ -wt (SLK-Dgk $\alpha$ -wt) e la Dgk $\alpha$ -KD (SLK-Dgk $\alpha$ -KD). A tal fine in queste cellule è stato utilizzato il sistema retrovirale PINCO descritto in Cutrupi et al. 2000. La generazione delle cellule SLK-Dgk $\alpha$ -wt ed SLK-Dgk $\alpha$ -KD è stata descritta nella tesi di dottorato di Annalisa Formentin. Le cellule utilizzate in questo studio sono state subclonate ottenendo linee cellulari stabili 100% GFP positive, esprimenti alti livelli di Dgk $\alpha$  ricombinante.

L'espressione della Dgk $\alpha$ -wt, della Dgk $\alpha$ -KD e della Dgk $\alpha$  endogena sono state valutate in western blot di lisati cellulari delle tre linee cellulari (Fig. 8).

### Reagenti

- R59949 (Sigma): inibitore delle diacilglicerolo chinasi relativamente selettivo per le Dgk di classe I. Lo stock è disciolto in DMSO alla concentrazione di 10 mM e conservato in aliquote a -20 °C. Quando viene usato l'inibitore, i controlli sono trattati con quantità equivalenti di DMSO.
- DO-24: anticorpo agonista monoclonale contro il dominio extracellulare di HGFR. Agonista di efficacia superiore al ligando endogeno, HGF (Prat et al. 1998).
- rhHGF (recombinant human hepatocyte growth factor; Peprotech): disciolto in PBS alla concentrazione di 1 ng/mL e conservato a -20 °C.
- rhVEGF-165 (recombinant human vascular endothelial growth factor): 38,2 KDa conservato in aliquote alla concentrazione di 10 mg/mL. Usato sempre con eparina.
- Fibronectina (Chemicon): purificata da plasma umano; stock alla concentrazione di 1 mg/ml da diluire in PBS a 10  $\mu$ g/mL al momento dell'uso. Conservata a 2-8 °C.
- Collagene I (Sigma): purificato da coda di ratto, disciolto in PBS con acido acetico 0,1 M alla concentrazione di 1 mg/mL, conservato a 2-8 °C e da diluire a 100  $\mu$ g/ml al momento dell'uso.
- Poli-lisina (sigma): massa molecolare 30-70 KDa. Conservata a -20 °C in aliquote da 1 mL, usata tal quale.
- Albumina serica bovina (BSA, Sigma): polvere da conservare a 2-8 °C.
- Gelatina: gentilmente fornita da Stefania Mitola presso il laboratorio di Candiolo.

- Eparina: gentilmente fornita da Stefania Mitola presso il laboratorio di Candiolo.

### **Saggio di Chemiotassi**

La valutazione della migrazione cellulare è stata effettuata in camera di Boyden modificata da 48 pozzetti (Neuro Probe), la camera è composta da quattro parti unite da viti: 1) parte inferiore contenente i pozzetti a fondo cieco; 2) membrana di polycarbonato con pori da 8  $\mu\text{M}$ ; 3) guarnizione di silicone; 4) parte superiore con 48 fori (Fig 1). Una volta assemblata, la camera presenta 48 pozzetti divisi orizzontalmente dalla membrana.

Nei pozzetti della parte inferiore della camera sono stati depositati 28-30  $\mu\text{L}$  di DMEM senza siero eventualmente addizionato di HGF (100 ng/ml) od R59949 (10  $\mu\text{M}$ ). Viene successivamente depositata la membrana in polycarbonato Neuro Probe, con pori da 8  $\mu\text{m}$ , precedentemente incubata per un'ora in una soluzione di Gelatina allo 0,1 % in PBS. Vengono aggiunte la guarnizione di silicone e la parte superiore della camera. Nei pozzetti superiori della camera così formati sono stati depositati 50  $\mu\text{L}$  della sospensione cellulare (cellule staccate con tripsina-EDTA, contate in camera di Burkner, centrifugate a 300 g per 5 minuti e risospese in DMEM senza siero alla densità di 2 milioni per mL) eventualmente con aggiunta di R59949 (10  $\mu\text{M}$ ). Il tutto è stato posto in camera umida e incubato a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> per 16-18 ore (a tempi più brevi il numero di cellule migrate in seguito a stimolazione con HGF era trascurabile).

Al termine dell'esperimento la camera viene smontata e la membrana rimossa. Le cellule non migrate sul lato superiore sono state asportate meccanicamente con tre passaggi su una spatola di gomma e con lavaggi in PBS. Le cellule migrate sul lato inferiore sono state fissate per immersione in metanolo ed essiccazione. Successivamente le cellule vengono colorate con il metodo Diff-Quick (Dade Behring) immergendo la membrana per 15 secondi in ciascuna delle tre soluzioni e rimuovendo il colorante in eccesso con abbondanti lavaggi in acqua. Infine le cellule migrate in ogni pozzetto vengono contate al microscopio in campo chiaro con ingrandimento 50x.

### **Saggio di invasione**

I saggi di invasione sono stati effettuati in traswell (Corning-Constar) di 6,5 mm con pori di 8  $\mu\text{m}$  pre-ricoperti con 10  $\mu\text{g}$  di Matrigel (BD Biosciences) in 50  $\mu\text{l}$  di terreno senza siero, lasciato solidificare per una notte a temperatura ambiente. 10<sup>5</sup> cellule MDA-MB-231 sono state deposte nella camera superiore e la camera inferiore è stata riempita con DMEM 2% FBS in presenza o assenza di 100 ng/ml HGF e R59949 1  $\mu\text{M}$  e le cellule sono state lasciate migrare per 18 ore. Dopo un lavaggio con PBS le cellule sulla faccia superiore del filtro sono state rimosse con un tampone e quelle sulla faccia inferiore colorate con Diff-Quick (Baxter) e contate.

### **Saggio di crescita in soft agar**

Cellule MDA-MB-231 sono state risospese in 0,35% agar in DMEM 1% FCS e piastrate ( $5 \times 10^4$  cellule/pozzetto in piastre da 12 pozzetti) su uno strato di 0,7% agar in DMEM 1% FCS in presenza o assenza di 1 o 10  $\mu\text{M}$  R59949. Dopo 20 giorni di incubazione le cellule superstiti sono state colorate con MTT e le colonie fotografate con un Versadoc (Biorad) e contate con il software QuantityOne (Biorad)

### **Saggio di adesione**

Le matrici sono state deposte nei pozzetti (piastra da 96 pozzetti) incubando 20 ore a 4 °C con 50  $\mu\text{L}$  di soluzioni di: fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), collagene I (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), BSA 1% (controllo negativo) o poli-lisina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , come controllo positivo). Le soluzioni sono state aspirate e i pozzetti lavati con PBS.

Per il distacco le cellule sono state lavate per tre volte con PBS, addizionate di PBS-EDTA 10 mM e lasciate in incubatore per 40 minuti. Le cellule staccate sono state contate in camera di Burkner, centrifugate a 300 g per 5 minuti e risospese in DMEM senza siero alla concentrazione di 2 milioni per mL eventualmente con l'aggiunta di R59949 (10  $\mu\text{M}$ ). 50  $\mu\text{L}$  della sospensione sono stati depositati in ogni pozzetto e la piastra è stata incubata a 37°C per 45 minuti.

Al termine del saggio le cellule ancora in sospensione sono state rimosse con tre lavaggi delicati con PBS e le cellule adese sono state fissate alla piastra con formaldeide (4% in PBS, 5 minuti). La piastra è stata lavata con PBS per tre volte e lasciata asciugare, successivamente le cellule sono state colorate con Cristalvioletto (5 mg/mL sciolto in etanolo-acqua 2:98, 30 minuti). Dopo cinque lavaggi con acqua, il colorante è stato disciolto con 100  $\mu\text{L}$  di DMSO per pozzetto in agitazione per 10 minuti e quantificato spettrofotometricamente a 570 nm usando come riferimento 405 nm.

### **Saggio di spreading**

Una piastra da 24 pozzetti è stata ricoperta per metà con fibronectina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS e per metà con collagene 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubata per 20 ore a 4 °C. Cellule SLK-Dgk $\alpha$ -wt ed SLK-Dgk $\alpha$ -KD sono state lavate tre volte con PBS e fatte distaccare mediante incubazione di 40 minuti (a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>) con PBS-EDTA 10 mM. Le cellule staccate sono state centrifugate a 300 g per 5 minuti, contate in camera di Burkner e risospese in terreno di coltura senza FCS alla densità di 30.000/mL, eventualmente aggiungendo R59949 (10  $\mu\text{M}$ ); 1 mL di sospensione è stato depositato in ogni pozzetto. Dopo un'incubazione di 40 minuti a 37 °C (per lo spreading su fibronectina) o 60 minuti (per lo spreading su collagene) di ogni pozzetto sono stati fotografati cinque campi al microscopio

con obiettivo 20X. Per ogni campo è stato contato il totale di cellule presenti ed il numero di quelle che hanno fatto spreading. La somma dei risultati di tutti e cinque i campi fornisce la percentuale di cellule “spreadate” per ciascun punto.

### **Incorporazione di 5-bromo-2'-deossipuridina.**

Le cellule staccate con tripsina-EDTA sono state contate, centrifugate a 300 g per 5 minuti e il pellet risospeso in DMEM con FCS al 10% alla densità di 10.000 cellule al mL. 100 µL di sospensione cellulare sono stati depositati in ogni pozzetto di una piastra da 96 successivamente incubata a 37 °C, in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub> per 24 ore. Il terreno nei pozzetti è stato sostituito con 100 µL di DMEM senza siero addizionato, dove indicato, con HGF (100 ng/ml) e R59949 (1 µM) e la piastra è stata incubata per ulteriori 24 ore. A questo punto a ogni pozzetto è stata aggiunta 5-bromo-2'-deossipuridina per ottenere una soluzione 10 µM e la piastra è stata incubata per ulteriori 6 ore.

La quantità di 5-bromo-2'-deossipuridina incorporata è stata valutata con il kit cell proliferation biotrak ELISA system, Amersham. In sintesi il protocollo del kit prevede :

- 1) fissazione/denaturazione del DNA 30 minuti a temperatura ambiente con 200 µL per pozzetto di soluzione 1;
- 2) saturazione 30 minuti con 200 µL per pozzetto di soluzione 2;
- 3) incubazione con anticorpo anti-5-bromo-2'-deossipuridina coniugato con perossidasi per 90 minuti, 100 µL per pozzetto;
- 4) tre lavaggi con 200 µL di soluzione 3;
- 5) rivelazione con 100 µL per pozzetto di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) in DMSO:acqua (15:85).

La reazione sviluppa un prodotto blu che viene seguito visivamente, a completo sviluppo la reazione viene arrestata con 100 µL per pozzetto di acido solforico 1 M in acqua che converte il prodotto in un colorante giallo che viene quantificato spettrofotometricamente a 450 nm entro 5 minuti. Per ogni esperimento si fanno anche controlli negativi (senza cellule e senza 5-bromo-2'-deossipuridina) il cui valore (sempre molto basso) viene sottratto a quello dei campioni.

### **Rilevamento fosfo-proteine: Bio-Plex**

Le cellule sono state coltivate in piastre da 12 pozzetti in DMEM al 10% di siero fino ad avere la confluenza (tre giorni), le cellule sono state mantenute nel terreno per altri due giorni fino ad esaurire i fattori del siero. In seguito le cellule sono state pretrattate con R59949 (10 µM) per 30 minuti e successivamente trattate con l'anticorpo DO24 ad una concentrazione di 10 nM per 30

minuti (queste sono le condizioni che in esperimenti pilota hanno fatto osservare la massima attivazione di Erk-1/2).

Al termine dell'incubazione il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lisate con il Bio-Plex™ cell lysis KIT (Biorad) che prevede:

- 1) lavaggio con 1 mL per pozzetto di tampone di lavaggio mantenendo la piastra in ghiaccio
- 2) lisi in 80 µL di soluzione di lisi per 20 minuti a 4 °C in agitazione.
- 3) centrifugazione a 4.500 g per 20 minuti a 4 °C per eliminare la parte non solubilizzata.
- 4) La concentrazione proteica viene determinata con il metodo BCA ed i campioni sono stati diluiti con soluzione di lisi in modo da avere tutti la stessa concentrazione (1,2 µg/µL) Il campione viene diluito nel tampone fornito dal kit 1:1 e poi congelato a -20 °C.

La quantificazione delle fosfoproteine con il metodo bioplex è stata eseguita dalla Biorad presso il laboratorio MBC di Torino.

### **Quantificazione proteine con metodo BCA**

La quantificazione della concentrazione proteica dei lisati cellulari è stata effettuata con il kit BCA Protein Assay (Pierce).

In una piastra da 96 pozzetti si dispongono in triplicato 25 µL di:

1. standard di BSA a concentrazione nota (diluizioni della soluzione di BSA fornita, in tampone di lisi per avere un range di concentrazioni da 25 a 2000 µg/mL);
2. uno o più bianchi;
3. lisati cellulari da quantificare;

Successivamente si aggiungono ai campioni ed agli standard 200 µL di soluzione di reazione (reagente A : reagente B 49:1), si agita delicatamente per 30 secondi e si incuba per 30 minuti a 37 °C. Al termine della reazione la piastra viene equilibrata a temperatura ambiente e si misura l'assorbanza dei pozzetti a 570 nm.

Per calcolare la concentrazione dei campioni si costruisce una retta di taratura con gli standard (in genere si ottiene un valore  $R^2$  maggiore o uguale di 0,99) e si calcola per interpolazione la concentrazione proteica dei campioni.

### **Analisi dei dati**

Ove appropriato i dati sono mostrati come media  $\pm$  errore standard. La significatività statistica delle differenze tra coppie di campioni è stata valutata usando il test T di Student.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### **L'attività enzimatica della Dgk $\alpha$ è necessaria per la chemiotassi indotta da HGF in cellule SLK.**

Una serie di studi condotti nel laboratorio di biochimica hanno dimostrato che in cellule endoteliali la stimolazione con HGF o VEGF attiva Dgk $\alpha$  e che l'inibizione di Dgk $\alpha$  blocca il movimento indotto da entrambi i fattori (Cutrupi et al. 2000, Baldanzi et al. 2004). Ci siamo quindi chiesti se Dgk $\alpha$  fosse parimenti necessaria per il movimento cellulare nelle cellule di sarcoma di Kaposi SLK che presentano alcuni marcatori endoteliali.

Il figura 1 si può osservare che HGF (100 ng/ml) induce un significativo aumento della migrazione cellulare nelle SLK; aumento che viene completamente annullato da R59949 alla dose di 10  $\mu$ M. Esperimenti precedenti avevano mostrato che R59949 alle dosi minime richieste per inibire Dgk $\alpha$  in vitro (1  $\mu$ M) non inibiva significativamente la migrazione indotta da HGF, facendo supporre che anche altre isoforme di diacilglicerolo chinasi meno sensibili a R59949 contribuiscano alla trasduzione del segnale chemotattico di HGF.

E' interessante notare che in analogia con quanto osservato in altri sistemi cellulari R59949 non inibisce la fortissima migrazione indotta da siero nelle cellule SLK, questo potrebbe essere dovuto ad una differenza nelle vie di trasduzione del segnale chemotattico utilizzate da HGF e dal siero oppure potrebbe essere dovuto all'adsorbimento di R59949 ad opera delle proteine seriche (De Chaffoy et al. 1989).

Ho utilizzato anche un approccio molecolare per inibire Dgk $\alpha$  utilizzando due linee cellulari: SLK-Dgk $\alpha$ -wt esprimenti stabilmente Dgk $\alpha$ -wt ed SLK-Dgk $\alpha$ -KD esprimenti un mutante di Dgk $\alpha$  cataliticamente inattivo che agisce da dominante negativo. Le cellule Dgk $\alpha$ -wt mostrano una migrazione comparabile alle SLK parentali che viene fortemente stimolata da HGF, nelle cellule SLK-Dgk $\alpha$ -KD si osserva ancora una migrazione indotta da HGF pur se di entità significativamente ridotta (fig. 2A). E' parimenti ridotta la forte migrazione indotta da siero (fig. 2B) suggerendo che Dgk $\alpha$  sia richiesta anche per la trasduzione del segnale promigratorio del siero e che la mancanza di effetti di R59949 sia dovuta al suo adsorbimento ad opera del siero stesso.

In parallelo le cellule sono anche state stimulate con VEGF (fino 200 ng/mL) che non ha indotto alcuna chemiotassi nelle cellule SLK (dati non mostrati), va notato che non è stata dimostrata in letteratura l'espressione di VEGFR-2 nelle cellule SLK.

Considerati nell'insieme questi dati suggeriscono che Dgk $\alpha$  contribuisce alla trasduzione del segnale pro-migratorio di HGF anche in questo modello cellulare. Il coinvolgimento di altre isoforme è suggerito da due osservazioni: i) per inibire completamente la migrazione sono richieste

dosi di inibitore più alte di quelle necessarie per inibire la sola isoforma alfa; ii) l'espressione del dominante negativo dell'isoforma alfa diminuisce ma non annulla la risposta migratoria.

### **R59949 riduce l'adesione e lo spreading di cellule SLK su fibronectina e collagene.**

Uno degli eventi chiave nella migrazione cellulare è la formazione di nuove adesione focali, costituite dalle integrine e da molteplici altre proteine di funzione sia strutturale sia di trasduzione. Le adesioni focali servono come punti di ancoraggio alla matrice extracellulare per il citoscheletro, che si riorganizza per poter esercitare le forze di tensione necessarie alla migrazione. Specifici dimeri  $\alpha/\beta$  di integrine fungono da recettori per i diversi componenti della matrice extracellulare.

Per verificare se l'inibizione di Dgk $\alpha$  influenzasse la capacità delle integrine di legare la matrice ho verificato la capacità delle SLK di aderire a due proteine della matrice extracellulare, la fibronectina ed il collagene I a cui aderiscono le cellule endoteliali primarie. Come controllo negativo di adesione è stata utilizzata la BSA mentre come controllo positivo di adesione è stata usata la polilisina; R59949 non influenza l'adesione non integrino-mediata a queste matrici. ho invece osservato una parziale diminuzione dell'adesione integrino-mediata (fibronectina e collagene) alle dosi più alte di R59949 (10  $\mu$ M) mentre non ci sono effetti alla dose di 1  $\mu$ M. In esperimenti condotti in parallelo non sono stati osservati difetti di adesione nelle cellule SLK-Dgk $\alpha$ -KD, che mantenevano la capacità di aderire a fibronectina e collagene in maniera indistinguibile dalle SLK parentali (dati non mostrati).

Ho inoltre valutato il coinvolgimento delle Dgk nella riorganizzazione cellulare indotta dall'adesione. In seguito ad adesione si osserva la formazione di un largo lamellipodio, si tratta di una struttura transiente la cui formazione può essere valutata microscopicamente in contrasto di fase e viene definito spreading. Analogamente a quanto osservato negli esperimenti di adesione il trattamento con R59949 10  $\mu$ M inibisce lo spreading di cellule SLK su fibronectina e collagene I (fig. 4), mentre R59949 1  $\mu$ M non ha effetti significativi (dati non mostrati). Va notato che gli effetti di R59949 sullo spreading sono più rilevanti di quelli sull'adesione: 40% di inibizione su fibronectina e 20% su collagene.

In analogia a quanto osservato nei saggi di adesione le SLK-Dgk $\alpha$ -KD non presentavano difetti significativi nello spreading quando confrontate con le SLK-Dgk $\alpha$ -wt e con le SLK parentali (dati non mostrati).

Questi dati fanno supporre che il difetto di migrazione osservato in cellule in cui Dgk $\alpha$  è inibita non sia dovuto ad una ridotta affinità delle integrine od ad una incapacità di rispondere al segnale mediato dalle integrine stesse. La parziale inibizione operata da R59949 10  $\mu$ M suggerisce inoltre

che altre isoforme di Dgk, meno sensibili all'inibitore, giochino un ruolo nel controllare l'adesione alla matrice extracellulare ed il riarrangiamento del citoscheletro indotto dall'adesione.

### **L'attività di Dgk $\alpha$ è necessaria per la proliferazione delle cellule SLK.**

Una delle ipotesi eziologiche sull'origine del sarcoma di Kaposi prevede che le lesioni siano dovute ad una iperproliferazione di cellule di derivazione endoteliale, dato che Dgk $\alpha$  è necessaria per la proliferazione delle cellule endoteliali ho voluto valutare se la sua attività enzimatica fosse necessaria anche per la proliferazione delle SLK. Queste cellule presentano una elevata incorporazione basale di 5-bromo-2'-deossiridina che risulta ulteriormente aumentata dal trattamento con HGF (100 ng/ml) o con siero 10%. Quando confrontate con le SLK-Dgk $\alpha$ -wt le cellule SLK-Dgk $\alpha$ -KD presentano un vistoso difetto di proliferazione sia in assenza di trattamenti sia dopo stimolazione con fattori di crescita (fig. 5). Similmente R59949 già alla concentrazione di 1  $\mu$ M inibisce vistosamente la proliferazione indotta da HGF (fig. 5).

In parallelo sono stati condotti esperimenti stimolando le cellule con concentrazioni di VEGF fino a 200 ng/ml che non hanno promosso una rilevabile proliferazione, consistentemente con quanto osservato nei saggi di migrazione, suggerendo che o le SLK non esprimono sufficienti livelli dei recettori per VEGF o non rispondono a questo fattore.

Questi dati indicano che l'attività enzimatica di Dgk $\alpha$  è indispensabile sia per la proliferazione spontanea delle cellule SLK sia per quella indotta da fattori di crescita e suggeriscono che un inibitore di Dgk $\alpha$  potrebbe far regredire le lesioni del sarcoma di Kaposi.

### **Effetti dell'inibizione di Dgk $\alpha$ sulla trasduzione del segnale di HGFR.**

Dagli esperimenti qui presentati e dalla letteratura si evidenzia che Dgk $\alpha$  è coinvolta nella trasduzione del segnale mitogenico e chemotattico di HGF. Ho quindi voluto valutare se Dgk $\alpha$  sia necessaria per l'attivazione di alcune delle vie di trasduzione del segnale di HGF ben caratterizzate in letteratura (Bardelli et al. 2005; Sharma et al 2003). Quindi ho misurato quantitativamente con il metodo Bioplex la fosforilazione di:

- a) Erk-1/2, attivato tramite Grb2-Sos-Ras-Raf-Mek
- b) Akt, attivato tramite PI3-K
- c) le altre Mapk note per essere attivate da HGF: p38 e Jnk.

Per la stimolazione si è utilizzato DO-24, un anticorpo agonista che in esperimenti preliminari è risultato superiore al ligando naturale di HGFR in condizioni che danno la massima fosforilazione di Erk-1/2 (30 minuti, 10 nM). In queste condizioni ho osservato una forte e riproducibile fosforilazione di Erk-1/2 e di Akt mentre contrariamente a quanto atteso non si ha fosforilazione di

p38 e Jnk (Fig .6 e 7). La mancata fosforilazione di p38 o Jnk potrebbe essere dovuta ad una specificità della linea cellulare utilizzata oppure potrebbe essere dovuta al fatto che i trattamenti sono stati ottimizzati per dare la massima fosforilazione di Erk1/2.

Il trattamento con R59949 alla concentrazione di 10  $\mu$ M, concentrazione (attiva nei saggi biologici precedentemente presentati) riduce la fosforilazione di Erk ed Akt ma in maniera poco rilevante e mai statisticamente significativa (fig. 6).

In maniera analoga le cellule SLK-Dgk $\alpha$ -KD mostrano una minore fosforilazione (sia basale sia indotta da HGF) di Erk-1/2 e di AKT rispetto alle cellule SLK-Dgk $\alpha$ -wt; tuttavia tale differenza è sempre di modesta entità e solo in alcuni esperimenti è risultata statisticamente significativa (fig. 7). Analoghi risultati sono stati ottenuti in altre linee cellulari, con una diminuzione di fosforilazione di Erk-1/2 ed Akt che è sempre parziale e solo occasionalmente significativa (si veda Cutrupi et al. 2000 e Chianale et al. 2007).

L'insieme dei dati qui esposti suggerisce che l'inibizione di Dgk $\alpha$  non influenzi in maniera rilevante la fosforilazione di Erk-1/2 e di Akt, seppure la modestissima riduzione osservata potrebbe suggerire un potenziale ruolo in condizioni di stimolazione più fisiologica del recettore.

Riassumendo le osservazioni su cellule SLK dimostrano che: i) l'inibizione di Dgk $\alpha$  ottenuta sia farmacologicamente sia per mezzo del dominante negativo riduce la chemiotassi e la proliferazione delle cellule SLK indotta da HGF e da siero; ii) concentrazioni elevate di R59949 riducono l'adesione e lo spreading di cellule SLK su fibronectina e collagene suggerendo il possibile coinvolgimento di altre isoforme di Dgk in questi fenomeni biologici; iii) l'inibizione di Dgk $\alpha$  ha effetti marginali sulla fosforilazione di Erk-1/2 e Akt suggerendo che i fenomeni biologici osservati non siano dovuti ne ad un blocco della funzione del recettore ne ad una alterazione di queste importanti vie di trasduzione.

Questi dati confermano che Dgk $\alpha$  svolge un ruolo di primo piano nella trasduzione del segnale mitogenico e chemotattico in cellule derivate dal sarcoma di Kaposi e suggeriscono che Dgk $\alpha$  possa essere un bersaglio per la terapia farmacologia del sarcoma di Kaposi e di altri tumori di origine endoteliale.

### **HGF promuove l'attivazione delle DGK di classe I in cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231**

Le cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231 sono molto usate come modello di carcinoma mammario ER-. Questa linea cellulare è considerata particolarmente adatta a studi pre-clinici per il suo fenotipo particolarmente aggressivo sia in vitro che in vivo (Price et al. 1990). Avevamo già dimostrato che la stimolazione con HGF è in grado di attivare Dgk- $\alpha$  in cellule epiteliali. ed endoteliali (Cutrupi et al. 2000, Baldanzi et al. 2004) abbiamo ipotizzato che HGF potesse aumentare l'attività DGK in cellule MDA-MB-231. Come atteso il trattamento con 100 ng/ml di HGF per 15 minuti induce un marcato aumento dell'attività Dgk cellulare misurata in vitro con substrati esogeni (Fig. 17). Questa attività è quasi totalmente inibita da R59949 1 $\mu$ M; a questa concentrazione l'inibitore inibisce preferenzialmente le DGK di classe I tra cui l'isoforma  $\alpha$  (.....) che è espressa dalle cellule MDA-MB-231 (P. Porporato comunicazioni personali). Nell'insieme questo dato dimostra una regolazione dell'attività DGK da HGF e suggerisce che in particolare sia regolata l'isoforma  $\alpha$ .

### **R59949 blocca l'invasione della matrice promossa da HGF in cellule MDA-MB-231**

Le cellule MDA-MB-231 presentano una elevata capacità di passare attraverso uno strato di matrigel, fenomeno che ricapitola in vitro l'invasione della matrice extracellulare in vivo. In questo sistema cellulare la capacità di invadere la matrice può essere ulteriormente incrementata da fattori motogeni tra cui HGF (Jeffers et al. 1996).

Come atteso le cellule MDA-MB-231 attraversano in poche ore lo strato di matrigel anche in assenza di fattori chemotattici ed in presenza di HGF 50 ng/ml la quantità di cellule che hanno attraversato la matrice aumenta significativamente (Fig. 18A). Il trattamento con 1  $\mu$ M R59949 diminuisce l'invasione spontanea e blocca completamente l'effetto di HGF. Questo dato dimostra che l'attività DGK è necessaria per l'invasione della matrice, in accordo a quanto osservato in altri sistemi cellulari (Chianale et al. 2007).

### **R59949 blocca la crescita in soft agar di cellule MDA-MB-231**

Il saggio di crescita in soft-agar valuta la capacità di cellule epiteliali trasformate di sopravvivere e moltiplicarsi in assenza di segnali di adesione in un mezzo semisolido.

Coerentemente con il loro fenotipo trasformato le cellule MDA-MB-231 mantenute in 1% FCS sono in grado di formare colonie in soft agar in 20 giorni. La presenza di R59949 1 mM riduce mentre R59949 10 mM azera il numero di colonie dimostrando che l'attivazione di DGK è necessaria per la crescita in assenza di segnali di ancoraggio (Fig. 18B).

Nell'insieme i dati ottenuti in cellule MDA-MB-231 dimostrano che: i) HGF aumenta una attività diacilglicerolo cinasica sensibile all'inibitore R59949 suggerendo il coinvolgimento dell'isoforma  $\alpha$ ; ii) il trattamento con l'inibitore R59949 1  $\mu$ M blocca l'invasione della matrice stimolata da HGF e iii) la crescita in assenza di ancoraggio in soft-agar. Nell'insieme questi dati suggeriscono che inibitori di Dgk potrebbero avere una applicazione nella terapia del carcinoma mammario negativo per il recettore degli estrogeni.

# Ruolo di DGK- $\theta$ nel preconditionamento epatico

## INTRODUZIONE

### *Diacilglicerolo e le diacilglicerolo chinasi*

Le DGK sono una famiglia di enzimi che catalizzano la fosforilazione ATP dipendente del diacilglicerolo (DAG) ad acido fosfatidico (PA), regolandone i livelli intracellulari.

Il diacilglicerolo (DAG) è un lipide con un'importante funzione di secondo messaggero cellulare coinvolto nella trasduzione del segnale di numerosi ormoni e fattori di crescita. I livelli intracellulari di DAG sono strettamente controllati da fattori extracellulari sia a livello della produzione ad opera delle fosfolipasi C (PLC) sia a livello del suo consumo, principalmente ad opera delle diacilglicerolo chinasi (DGK). Il DAG regola l'attività ed il reclutamento in membrana di numerose proteine caratterizzate dalla presenza di un dominio C1 ricco in cisteine, quali le proteine chinasi C (PKC), la proteina chinasi D, Unc-13, le chimerine e Ras-GRP; il DAG è anche in grado di regolare proteine non contenenti il dominio C1 quali TRPC2 (Sakane 2007).

Ben studiata è l'interazione tra DGK e PKC, una famiglia di serine-treonine chinasi, la cui attivazione e reclutamento in membrana dipendono da numerosi stimoli, quali calcio, DAG, fosfatidilserina e fosforilazione ad opera della chinasi 1 fosfoinositide-dipendente. In base alla modalità di regolazione le differenti isoforme di PKC sono divise in tre sottofamiglie: le PKC classiche, le PKC nuove e le PKC atipiche. La sottofamiglia delle PKC classiche comprende le isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$  e richiede la presenza di lipidi carichi negativamente, come la fosfatidilserina, DAG e calcio per la loro attivazione. La sottofamiglia delle nuove PKC comprende le isoforme  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ ; queste chinasi sono insensibili al calcio, ma richiedono la presenza di fosfatidilserina e DAG per la loro attivazione. La sottofamiglia delle PKC atipiche è costituita dalle isoforme  $\iota$  e  $\zeta$  e per la loro attivazione è richiesta solamente la presenza di fosfatidilserina, in quanto queste chinasi sono insensibili a calcio e DAG (Mellor 1998).

Le DGK, oltre a consumare DAG, producono PA, a sua volta un secondo messaggero intracellulare, prodotto anche dall'azione delle fosfolipasi D. PA è in grado di attivare numerose proteine quali fosfatidilinositolo 5-chinasi, RasGAP, Raf-1, mTOR e protein fosfatasi 1 (Sakane 2007).

Attualmente sono stati identificati dieci geni appartenenti alla famiglia delle DGK; alcuni di essi presentano splicing alternativi, portando il numero delle isoforme attualmente caratterizzate a 17. Le DGK condividono un dominio catalitico altamente conservato posto al C-terminale, preceduto da due o tre domini C1, omologhi a quelli delle PKC, mentre differiscono per i domini regolatori

posti all'N-terminale. Basandosi sull'omologia dei domini regolatori sono state classificate in cinque diverse sottofamiglie (Sakane 2007).

La prima sottofamiglia comprende le isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e possiede, a partire dall'N-terminale, un dominio recoverin omology (RVH) e due domini E-F hand, leganti il calcio. In questa famiglia l'N-terminale agisce come dominio di autoinibizione; la presenza di calcio promuove un cambio conformazionale, che permette la traslocazione dell'enzima dal citosol alle membrane cellulari e l'attivazione dell'enzima (Jiang 2000, Sakane 1991).

La seconda sottofamiglia comprende le isoforme  $\delta$ ,  $\eta$  e  $\kappa$  ed è caratterizzata: *i*) da un dominio PH in grado di legare fosfatidil-inositoli (Takeuchi 1997), *ii*) da quattro strutture coiled-coil e *iii*) dall'aver il dominio catalitico interrotto da un lungo inserto. Inoltre le DGK  $\delta$  e  $\eta$  presentano un dominio SAM al C-terminale, che media la loro omo- e etero-oligomerizzazione e influenza la loro localizzazione subcellulare (Imai 2002).

La terza sottofamiglia comprende solo l'isoforma  $\epsilon$ , la DGK più semplice dal punto di vista strutturale, in quanto possiede solo due domini C1 e il dominio catalitico e caratterizzata da una forte specificità per 2-arachidonil-DAG (Tang 1996).

La quarta sottofamiglia comprende le isoforme  $\zeta$  e  $\iota$  ed è caratterizzata dalla presenza di: *i*) quattro ankyrin repeats al C-terminale, *ii*) una sequenza omologa al MARCKS-PSD tra il dominio C1 e la regione catalitica che viene fosforilata da PKC e regola la localizzazione nucleare (Thopam 1998), *iii*) un potenziale sito PDZ-binding al C-terminale.

La quinta sottofamiglia è composta dalla sola isoforma  $\theta$ , che differisce dalle altre DGK per la presenza di tre domini C1, un dominio ricco in proline e glicine all'N-terminale, oltre ad un dominio PH, parzialmente sovrapposto ad un dominio di interazione a Ras. (Houssa 1997)

Tutte le DGK degli eucarioti sono enzimi solubili, che associano in maniera reversibile alle membrane cellulari dove è localizzato il loro substrato. Quindi, per questa famiglia di enzimi, esistono due livelli di regolazione: *i*) il controllo dell'associazione alle membrane e *ii*) il controllo dell'attività catalitica dell'enzima. Ad esempio Nelson et al. (2007) riportano che i recettori muscarinici M1 promuovono il metabolismo del DAG reclutando le DGK alla membrana tramite le  $\beta$ -arrestine. Mentre Yamaguchi Y. et al. (2006) evidenziano come l'attività catalitica della DGK- $\gamma$  sia controllata e aumentata dalla fosforilazione sulle serine 776 e 779 da parte della PKC- $\gamma$ .

### ***DGK- $\theta$ e RhoA***

DGK- $\theta$  è espressa ad alti livelli nel cervello ed a livelli minori nel fegato e nell'intestino di ratto (Houssa 1997); sono noti esempi di regolazione sia dell'attività enzimatica sia della localizzazione di questa isoforma.

La localizzazione di DGK- $\theta$  in cellule non stimolate è citoplasmatica ed è stata dimostrata la sua traslocazione in membrana in cellule stimolate con agonisti di recettori accoppiati a proteine G, quali ATP (van Baal 2005), bradikina (van Baal 2005), trombina (Bregoli 2001), noradrenalina (Walker 2001) e endotelina-1 (Clarke 2007). La traslocazione in membrana indotta da ATP, bradikina e trombina richiede i domini C1 ed è mediata da fosforilazione ad opera di PKC  $\epsilon$  o  $\eta$  (van Baal 2005). DGK- $\theta$  è già presente nel nucleo di cellule quiescenti e può venire ulteriormente accumulata in seguito a stimolazione con  $\alpha$ -trombina, svolgendo un ruolo rilevante anche nel metabolismo lipidico nucleare (Bregoli 2001).

L'attività enzimatica di DGK- $\theta$  può essere regolata sia positivamente sia negativamente. Infatti fattori di crescita, quali fattore di crescita neuronale (Tabellini 2004),  $\alpha$ -trombina (Bregoli 2001), noradrenalina ed endotelina-1 (Clarke 2007) ne promuovono l'attivazione; nel caso della noradrenalina questa attivazione è mediata dall'asse PI3-K/PKB (Clarke 2007). Al contrario Tu-Sekine et al. (2007) riportano che  $\alpha$ -trombina promuove l'inibizione di DGK- $\theta$ , innalzando la Km per il substrato senza fornire un meccanismo molecolare.

Un possibile meccanismo di inibizione di DGK- $\theta$  è fornito dall'osservazione che la piccola proteina G RhoA in forma attiva, legata a GTP, lega DGK- $\theta$  nel dominio catalitico, inibendone completamente l'attività enzimatica (Houssa 1999). DGK- $\theta$  non lega RhoA inattiva, legata a GDP, e neanche altre proteine G omologhe quali Rac, Cdc42 e Ras (Houssa 1999).

L'importanza fisiologica dell'inibizione di DGK- $\theta$  ad opera di Rho è stata evidenziata da eleganti studi genetici in *C. elegans*; in questo organismo DGK-1, l'ortologo di DGK- $\theta$  umana, consumando DAG ha un ruolo di regolatore negativo della trasmissione sinaptica (Miller 1999). Mc Mullan et al. (2006) riportano che per il rilascio di acetilcolina alla membrana presinaptica è necessaria l'attività di Rho-1, l'ortologo di Rho umana; uno dei principali ruoli di Rho-1 in questo contesto è legare e inibire DGK-1, permettendo un sufficiente accumulo di DAG.

RhoA è un membro della superfamiglia delle piccole GTPasi omologhe a Ras, proteine in grado di funzionare come indicatori molecolari, assumendo ciclicamente due conformazioni: una legata al GDP e generalmente inattiva, e una legata al GTP, attiva e in grado di influenzare l'attività degli effettori. Il passaggio tra le due forme è strettamente regolato: *i*) dall'attività GTPasi intrinseca di queste proteine, *ii*) da proteine che attivano l'attività GTPasica (GAP), *iii*) da fattori di scambio dei nucleotidi guaninici (GEF), che promuovono lo scambio di GDP con GTP, *iv*) da inibitori della dissociazione di nucleotidi guanidici (GDI) (Matozaki 2000).

L'attivazione di Rho è promossa da vari stimoli extracellulari, quali fattori di crescita e ormoni, ed interazioni cellula-matrice e cellula-cellula. Una volta attivi i membri della famiglia di Rho

regolano un'ampia varietà di risposte cellulari; ben studiato è il loro coinvolgimento nella riorganizzazione citoscheletrica (in particolare nell'organizzazione delle adesioni focali e nell'assemblaggio dei filamenti actinici) (Ridley 2001), ma giocano anche un ruolo di primo piano nel controllo del traffico vescicolare, della trascrizione genica e della progressione del ciclo cellulare (Matozaki 2000).

### *Il preconditionamento epatico*

L'ischemia può essere definita come uno sbilanciamento tra la quantità di ossigeno e substrati metabolici forniti a un tessuto e la quantità richiesta per una normale funzionalità. Nel fegato lo shock da ischemia/riperfusione ha una forte rilevanza clinica durante la chirurgia epatica e il trapianto, sia nella fase di conservazione dell'organo a freddo sia nella fase operatoria vera e propria. Nel fegato il danno da ischemia/riperfusione presenta due fasi: una fase iniziale nelle due ore successive alla riperfusione, caratterizzata da produzione e rilascio di specie reattive dell'ossigeno e morte epatocitaria, e una fase prolungata, fino a 48 ore, di tipo infiammatorio con reclutamento di neutrofili (Teoh 2003).

Il termine “Precondizionamento ischemico” evidenzia come brevi periodi di ischemia non letale, seguiti da riperfusione, proteggano il cuore ed altri organi dalle conseguenze di una successiva ischemia prolungata (Murry 1986). Questo fenomeno è stato particolarmente ben studiato a livello cardiaco e successivamente è stato dimostrato in molti altri organi, tra i quali il cervello, l'intestino, il muscolo scheletrico e il fegato (Teoh 2003). I meccanismi citoprotettivi implicati sono molteplici ed includono: il rilascio di adenosina e la produzione di NO (Peralta 1997 and Peralta 1999), il blocco del rilascio di TNF- $\alpha$  e cambi nel metabolismo energetico (Teoh 2003).

In particolare studi in vivo indicano che durante una breve ischemia si osserva accumulo extracellulare di adenosina, con attivazione dei recettori  $A_{2A}$ , e che agonisti di questi recettori mimano la protezione da ischemia/riperfusione (Peralta 1997). Il ruolo epatoprotettivo dell'adenosina durante il preconditionamento epatico è sottolineato da studi in vitro su epatociti isolati di ratto. In questo sistema cellulare purificato il preconditionamento è in grado di ridurre la morte cellulare per ipossia di circa il 35%; una protezione simile può essere ottenuta preincubando gli epatociti con adenosina o agonisti sintetici dei recettori per l'adenosina  $A_{2A}$ , quali il CGS21680. A conferma del ruolo dei recettori  $A_{2A}$  l'effetto protettivo del preconditionamento viene bloccato da antagonisti quali 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX); mentre l'utilizzo dell'antagonista dei recettori per l'adenosina  $A_{1A}$ , 8-cyclopenthy-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), non ha alcun effetto (Carini 2001).

La via di trasduzione classica del segnale del recettore  $A_{2A}$  risulta accoppiata a proteine G stimolatorie ( $G_{\alpha s}$ ) e alla produzione di cAMP, ma può coinvolgere anche proteine  $G_{\alpha q}$ , con attivazione di fosfolipasi  $\beta$ , e  $G_{\alpha olf}$ , accoppiate a stimolazione dell'adenilato ciclasi (Schulte 2003). Carini et al. (2001) indicano che in epatociti la protezione da preconditionamento è mediata da una via di trasduzione del segnale costituita da adenosina, recettori  $A_{2A}$ ,  $G_{\alpha i}$ , PLC, accumulo di DAG e attivazione delle PKC  $\delta$  e  $\epsilon$ . Gli stessi autori dimostrano che il trattamento con il solo DAG è in grado di riprodurre gli effetti epatoprotettivi del preconditionamento.

## **SCOPO DEL LAVORO**

Abbiamo quindi ipotizzato che le DGK, consumando DAG, svolgessero un ruolo di regolatori negativi del signaling epatoprotettivo mediato dai recettori  $A_{2A}$ . Abbiamo quindi dimostrato che l'attività DGK cellulare è modulata negativamente dal preconditionamento e dai recettori  $A_{2A}$ . Tra le diverse DGK l'isoforma  $\theta$  è inibita in seguito ad attivazione dei recettori  $A_{2A}$  con un meccanismo che coinvolge l'attivazione di RhoA. Infine i dati presentati suggeriscono che l'inibizione delle DGK cellulari sia un evento chiave per il preconditionamento in vitro; infatti l'inibitore farmacologico delle DGK R59949 mima il preconditionamento e viceversa la sovraespressione della DGK- $\alpha$  impedisce la citoprotezione.

## MATERIALI E METODI

### *Isolamento di epatociti primari di ratto e trattamenti*

Epatociti primari di ratto sono stati isolati dalla Dott. E. Alchera da ratti maschi Wistar (180-250 gr di peso). Gli epatociti vengono prelevati tramite perfusione epatica con collagenasi di tipo I (Sigma) e risospesi in terreno Krebs-Helseleit-HEPES (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{Na}(\text{HCO}_3)_2$ , 20 mM HEPES pH 7,4) a una densità cellulare finale di  $10^6/\text{mL}$ . Al termine della preparazione la vitalità cellulare è valutata con trypan blue; la vitalità di partenza è dell'85-80%.

Il preconditionamento ipossico è indotto esponendo gli epatociti a 10 minuti di ipossia (95%  $\text{N}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) seguiti da 10 minuti di riossigenazione (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ).

Lo stress ipossico è indotto mantenendo gli epatociti in 95%  $\text{N}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$  per i tempi indicati.

### *Colture cellulari e trasfezione*

Cellule HTC, una linea continua derivata da un epatoma di ratto Buffalo ottenuto alimentando l'animale per 12,4 mesi con 0,04% di N,N '-2,7-.fluorenylenebis-2,2,2-trifluoroacetamide; topi iniettati con cellule di epatoma hanno sviluppato un ascite, che è stato messo in coltura (Thompson1966). Le HTC sono cresciute in Dulbecco's modified Eagle's medium arricchito con siero fetale bovino 10% (Invitrogen), glutammax (Invitrogen), antibiotici e antimicotici (Sigma). Dgk- $\alpha$  è stata clonata in pcDNA 6.2/YFP-DEST per ottenere YFP-DGK- $\alpha$ -wt utilizzando la tecnologia Gateway (Invitrogen) come suggerito dal produttore. I plasmidi pEGFP (Clontech) e YFP-DGK- $\alpha$ -wt sono stati trasfettati in cellule HTC utilizzando Lipofectamine2000 (Invitrogen) come suggerito dal produttore.

### *Reagenti e anticorpi*

CGS 21680, agonista sintetico dei recettori purinergici  $\text{A}_{2\text{A}}$ , è stato fornito da Sigma, disciolto in DMSO ad una concentrazione di 1 mM è utilizzato alla concentrazione di 1  $\mu\text{M}$  per i tempi indicati.

Adenosina (Sigma) viene disciolta in DMSO ad una concentrazione di 250 mM ed utilizzata a una concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  per 15 minuti.

R59949 (Sigma), inibitore delle DGK con una forte attività sulle isoforme di classe I, viene disciolto in dimetilsolfossido alla concentrazione di 10 mM ed utilizzato alla concentrazione di 10 $\mu\text{M}$  per 15 minuti; in tutti gli esperimenti i controlli sono stati incubati con una quantità uguale di dimetilsolfossido.

La tossina C3 di *Clostridium Botulinum* (Cytoskeleton) è una versione modificata della tossina coniugata con un reagente lipofilico in grado di attraversare le membrane cellulari. La tossina C3 è stata ricostituita ed utilizzata alla concentrazione di 1µM per 120 minuti prima della stimolazione con CGS 21680; lotti differenti della tossina presentano attività differenti e quindi può essere necessario aumentare il tempo di trattamento e la concentrazione.

L'anticorpo policlonale di capra anti-DGK-θ N-16 (Santa Cruz biotechnology) riconosce i primi sedici aminoacidi della proteina.

L'anticorpo policlonale di coniglio anti-DGK-θ 104 ci è stato gentilmente donato da WJ van Blitterswijk (JCB 2005).

L'anticorpo policlonale di coniglio anti-Rho 119 (Santa Cruz biotechnology) riconosce le isoforme A e C.

L'anticorpo policlonale di coniglio anti-GST è stato acquistato da Santa Cruz biotechnology.

L'anticorpo secondario anti-coniglio IgG marcato con HRP proviene da NEN (PerkinElmer life science).

#### *Preparazione di lisati, omogenati cellulari, immunoprecipitazione e saggio DGK*

Per la misurazione dell'attività Dgk-θ  $2 \times 10^6$  epatociti di ratto sono stati precipitati per centrifugazione 1000 g per 2 minuti e lisati in 1ml di tampone di lisi (25 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 50 mM NaF, 10% glicerolo, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e inibitori proteasi Sigma). I lisati sono posti in rotazione a 4°C per 20 minuti e chiarificati centrifugando a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C. Dgk-θ è stata immunoprecipitata dal surnatante con 10 µg di SC-N16 o 150 µL di Ab104 coniugato con proteina G/sefariosio (Amersham); immunoprecipitati di controllo sono stati ottenuti utilizzando anticorpi da siero preimmune della stessa specie. Gli immunoprecipitati vengono lavati due volte ciascuno con tampone di lisi, LiCl (Tris 25 mM pH 8, LiCl 0,5 M) e TNE (Tris 25 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM).

Gli omogenati totali sono stati preparati risospendendo  $10^6$  epatociti in 300 µL di tampone di omogenizzazione (25 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 50 mM NaF, 10% glicerolo, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e inibitori proteasi (Sigma) e rompendo meccanicamente le cellule con 6 passaggi in una siringa con ago G25.

L'attività DGK in omogenati cellulari (25 µL) e in immunoprecipitati (25 µL) viene misurata in presenza di concentrazioni saturanti dei substrati (1 mg/ml 1-2 dioleil-glicerolo, 5mM ATP, 3 µCu/µL [ $\gamma^{32}$ P]-ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ZnCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, volume finale 50 µL). La miscela viene incubata per 5 minuti a 30°C e la reazione viene fermata aggiungendo 200 µl HCl 0,1 M ed i lipidi estratti con 200 µl CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 1:1. L'acido fosfatidico viene separato tramite TLC in

cloroformio:metanolo:acqua:ammoniaca 32% (60:47:10:3) su lastre di silica, precedentemente pretrattate con ossalato di potassio 1,3%-EDTA 5 mM:metanolo 3:2 ed essicate. [<sup>32</sup>P]PA è identificato attraverso co-migrazione con standard non radioattivo di PA colorato con incubazione con I<sub>2</sub>. Il segnale radioattivo viene rilevato e quantificato utilizzando GS-250 Molecular Imager e Phosphor Analyst Software (Biorad).

#### *Saggio di attivazione di RhoA/C*

Il saggio di attivazione di RhoA/C è stato effettuato seguendo il protocollo illustrato da Ren et al. (2000). Sintetizzando  $1 \times 10^6$  epatociti sono stati lisati in un mL di tampone di lisi (50 mM Tris pH 7,2, 1% Triton X-100, 0,5% sodio deossicolato, 0,1 SDS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, inibitori proteasi Sigma), chiarificati centrifugando a 13000 g per 10 minuti ed incubati con GST-Rhotekin-Ras Binding Domain (RBD) ricombinante coniugata con resina glutatione-sefariosio (Amersham Biosciences). Dopo 60 minuti di incubazione la resina viene lavata 4 volte con 1 mL di Tris buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, inibitori proteasi Sigma); le proteine legate alla resina sono state denaturate, separate per SDS-PAGE e RhoA/C attivo rilevato tramite western blot con anticorpi anti-RhoA/C; in parallelo sono state corse aliquote dei lisati totali. I western blot sono stati analizzati acquisiti utilizzando una Versadoc (Biorad) e la densità delle bande rilevata utilizzando il software Quantity One (Biorad). L'attivazione di RhoA/C è misurata come rapporto tra la quantità di RhoA/C attivo precipitata da GST-Rhotekin-RBD e la quantità di RhoA/C presente nei lisati corsi in parallelo (5% del totale).

#### *Quantificazione DAG*

L'estrazione e la quantificazione del DAG in epatociti primari di ratto sono state effettuate secondo il protocollo descritto in Nobe et al. 1993.  $2 \times 10^6$  epatociti sono stati precipitati centrifugando a 1000 g per 2 minuti ed i lipidi estratti con 75 µl di cloroformio:metanolo 2:1 e le fasi risolte con 200 µl di H<sub>2</sub>O e 200 ml di CHCl<sub>3</sub>. La miscela viene agitata vigorosamente per 60" e le fasi separate per centrifugazione 10000 g 5'. Il DAG viene separato con TLC in etere di petrolio:eptano:acido acetico 75:25:1 su lastre di silica. A separazione ultimata le lastre vengono colorate con blu di Comassie 0,03% in 30% CH<sub>3</sub>OH e 100 mM NaCl per 30 minuti e decolorate con 30% CH<sub>3</sub>OH e 100 mM NaCl per cinque minuti; le lastre sono state essicate e acquisite con uno scanner. Il DAG viene identificato e quantificato per comigrazione con una retta di taratura di arachidonil-stearoil glicerolo utilizzando il programma Quantity One (Biorad).

### *Analisi della vitalità cellulare*

La vitalità degli epatociti è stata determinata con il test di esclusione del trypan blue contando circa cento cellule per ogni misurazione.

La vitalità cellulare delle cellule trasfettate è stata misurata dopo aver incubato le cellule ( $1 \cdot 10^6$ /mL) con propidio ioduro (PI) 10  $\mu$ g/mL per cinque minuti. Brevemente è stata misurata contemporaneamente la fluorescenza GFP o YFP (indistinguibili con la strumentazione utilizzata) in FL-1 e la fluorescenza dovuta all'incorporazione del propidio ioduro in cellule necrotiche in FL-2; per ogni esperimento sono stati eseguiti opportuni controlli quali cellule GFP-/PI-, GFP+/PI- e GFP-/PI+. La vitalità delle cellule trasfettate è stata determinata come:  $(\text{cellule GFP+ e PI -})/(\text{cellule GFP+}) \cdot 100$ .

## RISULTATI

### *L'attivazione dei recettori purinergici A<sub>2A</sub> diminuisce l'attività DGK in epatociti primari di ratto*

In epatociti di ratto i recettori purinergici A<sub>2A</sub> sono in grado di promuovere l'attivazione della PLC- $\beta$  portando all'accumulo di DAG e alla conseguente attivazione delle PKC  $\delta$  e  $\epsilon$  (Carini 2001). Mi sono chiesta se, oltre a regolare la produzione di DAG, questi recettori fossero anche in grado di regolarne il metabolismo ad opera delle DGK.

Per verificare questa ipotesi ho misurato l'attività diacilglicerolo chinasi in omogenati totali di epatociti primari di ratto, trattati per 5, 15, 30 minuti con l'agonista sintetico dei recettori A<sub>2A</sub>, CGS 21680 (1  $\mu$ M). Sorprendentemente ho osservato una riduzione dell'attività DGK totale in cellule trattate con CGS 21680, che è già significativa a 15 minuti e arriva al 50% del controllo a 30 minuti (Fig.9).

Per confermare quanto osservato in cellule trattate con CGS 21680, ho stimolato epatociti primari di ratto con adenosina, l'agonista fisiologico dei recettori A<sub>2A</sub>. Anche il trattamento con adenosina (10  $\mu$ M, 15 minuti) induce una significativa riduzione dell'attività DGK in omogenati totali di epatociti primari di ratto (Fig. 10 pannello B). La concentrazione di adenosina usata è risultata essere la minima efficace in un esperimento preliminare di dose risposta (dato non mostrato), probabilmente l'effetto inibitorio dell'adenosina è minore di quello del CGS 21680 a causa della rapida degradazione operata dagli epatociti (Leser 1989, Kocić 1998).

Il rilascio di adenosina e l'attivazione dei recettori A<sub>2A</sub> sono eventi chiave durante il preconditionamento ipossico degli epatociti. In vitro un breve stress ipossico promuove il rilascio di adenosina e rende gli epatociti più resistenti a successivi lunghi periodi di ipossia (Carini 2001). Per verificare se il preconditionamento ipossico fosse in grado di regolare l'attività DGK ho sottoposto epatociti primari di ratto a un ciclo di 10 minuti di ipossia seguiti da 10 minuti di riossigenazione; questo trattamento ha indotto una significativa diminuzione dell'attività DGK totale (Fig. 10 pannello A).

Nell'insieme i risultati riportati dimostrano un'inibizione dell'attività DGK durante il preconditionamento ipossico suggerendo che questa inibizione sia mediata dal rilascio di adenosina e dalla stimolazione dei recettori A<sub>2A</sub>.

### *La stimolazione dei recettori A<sub>2A</sub> inibisce l'attività di DGK- $\theta$ , tramite RhoA.*

Mi sono chiesta quale delle dieci isoforme di DGK note fosse inibita in seguito all'attivazione dei recettori A<sub>2A</sub>. La regolazione dell'attività DGK è specifica per le diverse isoforme; in particolare è noto che le isoforme  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\zeta$  possono essere fosforilate ed inibite da PKC, mentre

DGK- $\theta$  è inibita dall'interazione diretta con RhoA attivo. Una serie di esperimenti ha evidenziato che inibitori di PKC e PKA, quali cheleritina e H89, non avevano effetto sull'inibizione dell'attività DGK in cellule stimulate con CGS 21680, suggerendo che il fenomeno osservato non fosse dovuto a fosforilazione delle isoforme  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\zeta$  ad opera delle PKC (dati non mostrati).

Per valutare se l'isoforma  $\theta$  fosse regolata dai recettori  $A_{2A}$  epatociti primari di ratto sono stati trattati per 15 o 30 minuti con CGS 21680 1  $\mu$ M, lisati in tampone con detergente e l'attività DGK- $\theta$  misurata in immunoprecipitati con anticorpi isoforma specifici. In Fig. 11A si può osservare che a 15 minuti c'è una inibizione riproducibile ma quantitativamente non significativa, mentre a 30 minuti il trattamento con CGS 21680 riduce l'attività di DGK- $\theta$  al 30% del controllo; risultati analoghi sono stati ottenuti con un diverso anticorpo (Fig. 11B).

Houssa et al. mostrano che RhoA, in forma attiva legata a GTP, è in grado di attivare e inibire DGK- $\theta$  legandosi al suo dominio catalitico (1999). Non sono presenti in letteratura dati sullo stato di attivazione di RhoA in epatociti stimolati con adenosina, per prima cosa ho quindi voluto verificare se la stimolazione di epatociti primari di ratto con CGS 21680 promuova l'attivazione di RhoA. Per misurare lo stato di attivazione di RhoA ho precipitato RhoA legata a GTP utilizzando come esca il dominio RBD di Rhotekin coniugato a GST (Ren 2000). La quantità di RhoA presente in epatociti primari di ratto non è influenzata dal trattamento con CGS 21680 1  $\mu$ M per 30 minuti, che aumenta però significativamente la frazione di RhoA attivo precipitato da GST-Rhotekin-RBD, dimostrando che RhoA è attivata dai recettori  $A_{2A}$  (Fig. 12). La qualità dei western blot anti-RhoA/C mostrati non è ottimale a causa della scarsa efficienza degli anticorpi utilizzati nel riconoscere RhoA/C di ratto.

Per verificare il coinvolgimento di Rho nella trasduzione del segnale epatoprotettivo del CGS 21680, ho utilizzato una versione della tossina C3 di *Clostridium Botulinum* in grado di penetrare la membrana cellulare. Questa tossina inattiva per ADP-ribosilazione i membri della famiglia di Rho in vivo, ma non proteine correlate, quali Cdc42 o Rac (Aktories 1989).

Come già riportato in letteratura CGS 21680 1  $\mu$ M protegge gli epatociti primari di ratto dalla necrosi indotta da stress ipossico (Carini 2001); l'inibizione di Rho con la tossina C3 (1  $\mu$ M per 120 minuti) non influenza la vitalità degli epatociti controllo, ma riduce del 50% gli effetti protettivi del CGS 21680 (Fig. 13).

Nell'insieme questi dati dimostrano che CGS 21680 è in grado di attivare Rho e che l'attività di Rho è necessaria per l'azione epatoprotettiva del CGS 21680. Questo e dati riportati in letteratura, secondo cui RhoA attivato è in grado di legare e inibire DGK- $\theta$  (Houssa 1999), fanno supporre che l'inibizione di DGK- $\theta$  da me osservata si mediata da RhoA attivo.

Per verificare questa ipotesi epatociti primari di ratto sono stati pretrattati o meno con la tossina

C3 (1  $\mu\text{M}$  per 120 minuti), trattati con CGS 21680 (1  $\mu\text{M}$  per 30 minuti), lisati e l'attività di DGK- $\theta$  misurata in immunoprecipitati ottenuti con anticorpi isoforma specifici. L'inibizione di RhoA con la tossina C3 non influenza l'attività DGK- $\theta$  basale, ma azzerava gli effetti inibitori del CGS 21680 (Fig. 14).

L'insieme dei risultati riportati suggerisce l'esistenza di una nuova via di trasduzione del segnale epatoprotettivo dell'adenosina, che comprende i recettori  $A_{2A}$ , RhoA e DGK- $\theta$ , contribuendo all'accumulo di DAG.

### ***Le DGK prevengono l'accumulo di DAG e antagonizzano l'azione epatoprotettiva del CGS 21680.***

Per dimostrare la rilevanza fisiologica di quanto osservato abbiamo manipolato sperimentalmente l'attività DGK cellulare sia positivamente sia negativamente.

Per diminuire l'attività DGK cellulare abbiamo utilizzato un inibitore farmacologico ben caratterizzato, R59949 in grado di inibire numerose isoforme con una preferenza per le DGK di classe I. Il trattamento di epatociti primari di ratto per 15 minuti con R59949 alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  è in grado di promuovere un accumulo di DAG comparabile a quello misurato dopo trattamento con CGS 21680 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 15 pannello A). Parallelamente il pretrattamento con R59949 (15 minuti 10  $\mu\text{M}$ ), presumibilmente tramite l'accumulo di DAG, rende gli epatociti primari resistenti alla necrosi indotta da stress ipossico, con un'efficacia comparabile al CGS 21680 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 15 pannello B).

Per aumentare l'attività DGK abbiamo overespresso transientemente GFP o YFP-DGK- $\alpha$ -wt, una isoforma che esperimenti di controllo hanno indicato non essere inibita da CGS 21680 (dati non mostrati). Data la refrattarietà degli epatociti primari alla trasfezione per questi esperimenti ho utilizzato cellule HTC, una linea cellulare derivata da epatoma di ratto, in cui il CGS 21680 protegge da morte cellulare indotta da ipossia.

Tramite analisi citofluorimetrica abbiamo identificato le cellule trasfettate (YFP<sup>+</sup>) e contemporaneamente ne abbiamo valutato la vitalità (propidio ioduro<sup>-</sup>). Come atteso in cellule trasfettate con GFP si osserva un dimezzamento della vitalità dopo 120 minuti di ipossia, questa morte cellulare risulta completamente azzerata in presenza di CGS 21680 1  $\mu\text{M}$ . Cellule esprimenti YFP-DGK- $\alpha$ -wt presentano una morte da ipossia simile, ma non vengono protette dal CGS 21680 (Fig. 16) suggerendo che la sovraespressione di una attività DGK non regolata da CGS 21680 impedisca l'accumulo di DAG necessario per l'effetto citoprotettivo di CGS 21680.

Nell'insieme questi esperimenti dimostrano che il metabolismo del DAG ad opera delle DGK è un punto chiave nella decisione vita/morte durante lo stress ipossico e suggeriscono che l'inibizione dell'attività DGK sia necessaria per l'azione citoprotettiva dei recettori  $A_{2A}$ .

## DISCUSSIONE

Vi è un crescente interesse nei riguardi dei meccanismi molecolari coinvolti nel preconditionamento per le possibili applicazioni nel prevenire il danno da ischemia/riperfusionazione durante interventi di chirurgia e trapianto nell'uomo. Lo studio del preconditionamento nasce dall'osservazione che un breve periodo ischemico promuoveva una maggiore resistenza del cuore ad una successiva prolungata ischemia (Murry 1986). La trasduzione del segnale del preconditionamento è stata condotta principalmente nel cuore e solo più recentemente nel fegato, con risultati spesso sovrapponibili.

Un ruolo di primo piano nel preconditionamento, sia nel cuore sia nel fegato, è svolto dal rilascio di adenosina e dall'attivazione dei corrispondenti recettori accoppiate a proteine G (Peralta 1997). In particolare nel cuore un ruolo principale è svolto dai recettori di tipo  $A_1$  e  $A_3$ , mentre a livello epatico i recettori responsabili dell'azione citoprotettiva sono gli  $A_{2A}$  (Liang 1998, Parsons 2000, Peralta 1997). In entrambi i casi l'accumulo di DAG e l'attivazione di PKC risultano necessari e sufficienti per l'effetto citoprotettivo (Tosaki A. et al. 1997- Carini et al. 2001- Lee JE 2001). Nel caso dei recettori di tipo  $A_1$  nel cuore e  $A_{2A}$  nel fegato l'accumulo di DAG è mediato dall'attivazione della PLC- $\beta$  ad opera delle  $G_i$ , mentre nel caso dei recettori di tipo  $A_3$  viene prodotto PA ad opera di una PLD attivata da RhoA e successivamente il PA viene convertito in DAG da una PA fosfatasi (Lee 2001).

Data l'importanza del DAG nel mediare il preconditionamento epatico ho ipotizzato l'esistenza di una regolazione dell'attività DGK in epatociti sottoposti a preconditionamento o trattati con agonisti dei recettori  $A_{2A}$ .

Gli esperimenti mostrati in questa tesi dimostrano che in epatociti primari di ratto l'attività DGK è considerevolmente inibita sia dal preconditionamento sia dall'attivazione dei recettori  $A_{2A}$  con l'agonista CGS 21680 o con adenosina. In particolare i miei dati indicano che delle dieci isoforme di DGK attualmente note l'isoforma  $\theta$ , presente nel fegato, risulta inibita in seguito a stimolazione dei recettori  $A_{2A}$  con CGS 21680; tuttavia i dati presentati non escludono che altre isoforme risultino regolate durante il preconditionamento epatico. Non è l'unico caso di inibizione di DGK- $\theta$  noto in quanto precedentemente è stato osservato che il trattamento con  $\alpha$ -trombina di fibroblasti aumenta considerevolmente la  $K_m$  della DGK- $\theta$  per il DAG (Tu-Sekine 2007).

Houssa et al. (2005) forniscono un possibile meccanismo di inibizione di DGK- $\theta$ , dimostrando che RhoA attivo lega il dominio catalitico di questa isoforma inibendone l'attività enzimatica (Los AP 2003, Houssa 2005). Per verificare l'ipotesi che l'inibizione di DGK- $\theta$  sia mediata da RhoA attivo abbiamo dimostrato che: *i*) la stimolazione dei recettori  $A_{2A}$  con CGS 21680 attiva RhoA; *ii*)

l'inibizione di RhoA, ottenuta utilizzando la tossina C3 ribosil transferasi, è necessaria per l'effetto citoprotettivo del CGS 21680; *iii*) la tossina C3 blocca l'effetto inibitorio di CGS 21680 su DGK- $\theta$ . Un ruolo per RhoA nella trasduzione del segnale citoprotettivo dell'adenosina era stato già ipotizzato da Lee et al. (2001) in cardiomiociti fetali di pollo; anche in questo sistema RhoA è necessario per l'accumulo di DAG, che in questo caso risulta prodotto dall'azione sequenziale della PLD e della PA fosfatasi. Non sono presenti in letteratura studi sul meccanismo di attivazione di RhoA in cellule trattate con adenosina, per quanto sia ben noto che gli effetti biologici di molti recettori accoppiati a proteine G sono mediati da Rho e che diversi RhoGEF (quali p115-RhoGEF e PDZ-RhoGEF) sono legati ed attivati da  $G\alpha$  ( $G_{\alpha 13}$  e  $G_{\alpha i}$ ) (Seasholtz TM 1999).

Per verificare la rilevanza fisiologica dell'inibizione dell'attività DGK durante il preconditionamento epatico ho: *i*) trattato epatociti primari di ratto con l'inibitore farmacologico di DGK R59949, osservando un accumulo di DAG e un marcato effetto citoprotettivo; *ii*) sovraespresso DGK- $\alpha$  (isoforma non regolata da CGS 21680) in cellule HTC osservando un blocco dell'effetto citoprotettivo del CGS 21680. Queste osservazioni suggeriscono che l'inibizione della attività DGK sia un evento necessario per l'accumulo di DAG e la citoprotezione indotti da adenosina in epatociti primari di ratto.

L'esistenza di una via di trasduzione del segnale Rho/DGK- $\theta$ /DAG in vivo è stata già dimostrata in terminali presinaptici di *C.elegans*; in questo sistema cellulare il legame e l'inibizione della DGK-1 ad opera di Rho è critico per l'accumulo del DAG necessario al reclutamento di Unc-13 ed al rilascio del neurotrasmettitore (Mc Mullan 2006).

Nel nostro sistema sperimentale i dati ottenuti da Mari Paola Nitti (Genova) indicano che l'inibizione delle DGK con R59949 10  $\mu$ M promuove un'attivazione delle nuove PKC- $\delta$  e - $\epsilon$  e comparabile con quella osservata in epatociti trattati con CGS 21680. L'attivazione di queste PKC ed il fatto che la loro attività è necessaria per il preconditionamento indotto da CGS 21680 (Carini 2001), suggerisce che queste due isoforme mediano gli effetti citoprotettivi dell'inibizione di DGK- $\theta$ .

Concludendo i dati riportati in questa tesi permettono di implementare un modello della trasduzione del segnale citoprotettivo dell'adenosina in cui, per l'accumulo del DAG necessario all'attivazione delle PKC- $\delta$  e - $\epsilon$ , è richiesta la contemporanea attivazione della PLC- $\theta$ , ad opera di  $G_i$ , e l'inibizione della DGK- $\theta$ , ad opera di RhoA. Inoltre questo studio suggerisce che inibitori di DGK possano avere un effetto epato-protettivo, aprendo la via a possibili applicazioni cliniche.

## BIBLIOGRAFIA

- Aktories K, Braun U, Rösener S, Just I, Hall A (1989) *Biochem Biophys Res Commun.* 158, 209-213
- Bacchiocchi R., Gianluca Baldanzi, Damiano Carbonari, Catia Capomagi, Emanuela Colombo, Wim J. van Blitterswijk, Andrea Graziani, Francesca Fazioli; 2005; Activation of  $\alpha$ -diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase; *Blood*; vol. 106, n. 6, 2175-82.
- Baldanzi G, Cutrupi S, Chianale F, Gnocchi V, Rainero E, Porporato P, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Parolini O, Bussolino F, Sinigaglia F, Graziani A. Diacylglycerol kinase- $\alpha$  phosphorylation by Src on Y335 is required for activation, membrane recruitment and Hgf-induced cell motility. *Oncogene.* in press 2007
- Baldanzi G., Stefania Mitola, Santina Cutrupi, Nicoletta Filigheddu, Wim J van Blitterswijk, Fabiola Sinigaglia, Federico Bussolino, Andrea Graziani, 2004; Activation of diacylglycerol kinase  $\alpha$  is required for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro; *Oncogene*, 17, 23(28), 4828-4838.
- Bardelli C., Marilena Sala, Umberto Cavallazzi, Maria Prat; 2005; Agonist Met antibodies define the signalling threshold required for a full mitogenic and invasive program of Kaposi's Sarcoma cells; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. 334, 1172–1179.
- Bartoldo D.D., Ethel Cesarman; 2004; Uncovering the complexities of Kaposi's sarcoma through genome-wide expression analysis; *Genome Biology*, vol. 5, n. 11, articolo 247.
- Beviglia L, Matsumoto K, Lin CS, Ziober BL and Kramer RH: Expression of the c-met/HGF receptor in human breast carcinoma: correlation with tumor progression. *Int J Cancer* 74: 301-309, 1997.
- Bregoli L, Baldassare JJ, Raben DM (2001) *J Biol Chem.* 276, 23288-23295
- Brian G. Herndier, Albrecht Werner, Paul Arnstein, Nancy W. Abbey, Francesco Demartis, Rober L. Cohen, Marc A. Shuman, Jay A. Levy; 1994; Characterization of a human Kaposi's sarcoma cell line that induces angiogenic tumors in animals; *AIDS*, n. 8, 575-581.
- Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffey A and Comoglio PM: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119: 629-641, 1992.
- Camp RL, Rimm EB and Rimm DL: Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymphnode negative breast carcinoma. *Cancer* 86: 2259-2265, 1999.
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti PM, Paola D, Pronzato MA, Albano E (2001) *Hepatol.* 33, 131-139
- Chang Y., Ethel Cesarman, Melissa S. Pessin, Frank Lee, Janice Culpepper, Daniel M. Knowles, Patrick S. Moore; 1994, Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma; *Science*, vol. 266, 1865-1869.

- Chianale F., S. Cutrupi, E. Rainero, G. Baldanzi, P.E. Porporato, S. Traini, N. Filigheddu, V.F. Gnocchi, M.M. Santoro, O. Parolini, Wim J. van Blitterswijk, F. Sinigaglia and A. Graziani. Diacylglycerol kinase- $\alpha$  mediates HGF-induced epithelial cell scatter by regulating Rac activation and membrane ruffling. *Mol Biol Cell*. in press 2007
- Clarke CJ, Ohanian V, Ohanian J (2007) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292, 2248-2256
- Courcelles D.C, Peter Roevens, Herman Van Belle, Ludo Kennis, Yves Somers, Fred De Clerck; 1989; The role of endogenously formed diacylglycerol in the propagation and termination of platelet activation. A biochemical and functional analysis using the novel diacylglycerol kinase inhibitor, R 59 949 *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, n.6, 3274-3285.
- Cutrupi S, Gianluca Baldanzi, Daniela Gramaglia, Antonella Maffè, Dick Shaap, Enrico Giraud, Wim J. van Blitterswijk, Federico Bussolino, Paolo M. Comoglio, Andrea Graziani; 2000; Src-mediated activation of  $\alpha$ -diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor induced cell motility; *EMBO*, vol. 19, n. 17, p. 4614 - 4622.
- Flores I., Teresa Casaseca, Carlos Martinez-A, Hideo Kanoh, Isabel Merida; 1996; Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced  $\alpha$ -diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation; *The journal of Biological Chemistry*; vol. 271, n.17, 10334-10340.
- Francès C.; 1998; Kaposi's sarcoma after renal transplantation; *Nephrol Dial Transplant* n. 13; 2768-2773.
- Ghoussoub RA, Dillon DA, D'Aquila T, Rimm EB, Fearson ER and Rimm DL: Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* 82: 1513-1518,1998.
- Grant DS, Kleinman HK and Goldberg ID: Scatter factor induces blood-vessel formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1937-1941, 1993.
- Houssa B, de Widt J, Kranenburg O, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ (1999) *J Biol Chem*. 274, 6820-6822
- Houssa B, Schaap D, van der Wal J, Goto K, Kondo H, Yamakawa A, Shibata M, Takenawa T, van Blitterswijk WJ (1997) *J Biol Chem*. 272, 10422-10428
- Imai S, Sakane F, Kanoh H (2002) *J Biol Chem*. 277, 35323-35332
- Iscovich J., Paolo Boffetta, Silvia Franceschi, Esther Azizi, Ronit Sarid; 2000; Classic Kaposi sarcoma, epidemiology and risk factors; *Cancer*, vol. 88, n. 3, 501-517.
- Jeffers M, Rong S and Vande Woude GF: Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med* 74: 505-513, 1996.
- Jiang Y, Qian W, Haves JW, Walsh JP (2000) *J Biol Chem*. 275, 34092-34099

- Jin L, Fuchs A, Schnitt SJ, Yao Y, Joseph A, Lamszus K, Park M, Goldberg ID and Rosen EM: Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer* 79: 749-760, 1997.
- Kocić G, Kocić R, Vlahović P, Pavlović D, Jevtović T (1998) *J Viral Hepat.* 5, 353-356
- Lamszus K, Laterra J, Westphal M and Rosen EM: Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) content and function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci* 17: 517-530, 1999.
- Lee JE, Bokoch G, Liang BT (2001) *FASEB J.* 15, 1886-1894
- Leser HG, Holstege A, Gerok W (1989) *Hepatol.* 10, 66-71
- Liang BT, Jacobson KA (1998) *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 6995-6999
- Los AP, van Baal J, de Widt J, Divecha N, van Blitterswijk WJ (2003) *Biochim Biophys Acta.* 1636, 169-174
- Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y (2000) *Cell Sign.* 12, 515-524
- McMullan R, Hiley E, Morrison P, Nurrish SJ (2006) *Genes & Dev.* 20, 65-76
- Meiners S, Brinkmann V, Naundorf H, Birchmeier W. Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. *Oncogene.* 1998 Jan 8;16(1):9-20.
- Mellor H, Parker PJ (1998) *Biochem J.* 332, 281-292
- Miller KG, Emerson MD, Rand JB (1999) *Neuron.* 24, 323-333
- Mitola S., Raffaella Soldi, Ilaria Zanoni, Luca Barra, Maria Ines Gutierrez, Ben Berkhout, Mauro Giacca, Federico Bussolino; 2000; Identification of Specific Molecular Structures of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Relevant for Its Biological Effects on Vascular Endothelial Cells; *Journal of Virology*, vol. 74, n. 1, 344-353.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) *Circulation.* 74, 1124-1136
- Neipel F., Bernhard Fleckenstein; 1999; The role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma; *Cancer Biology*, vol.9, 151-164.
- Nelson CD, Perry SJ, Regier DS, Prescott SM, Topham MK, Lefkowitz RJ (2007) *Science.* 315, 663-666
- Olenchock B.A., Rishu Guo, Jeffery H. Carpenter, Martha Jordan, Matthew K. Topham, Gary A. Koretzky, Xiao Ping Zhong; 2006; Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy; *Nature Immunology*, vol. 7, n. 11, 1174-1181.
- Osborne CK: Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 51: 227-238, 1998.
- Parsons M, Young L, Lee JE, Jacobson KA, Liang BT (2000) *FASEB J.* 14, 1423-1431

- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rossellò-Catafau J (1997) *Hepatol.* 25, 934-937
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rossellò-Catafau J (1999) *hepatol.* 29, 126-132
- Prakash O., Zhen-Ya Tang, You-e He, Manzoor S. Ali, Roy Coleman, Javed Gill, Gist Farr, Felipe Samaniego; 2000; Human Kaposi's sarcoma cell-mediated tumorigenesis in human immunodeficiency type 1 Tat-expressing transgenic mice; *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 92, n. 9, 721-728.
- Prat M., Tiziana Crepaldi, Selma Pennacchiotti, Federico Bussolino, Paolo M. Comoglio; 1998; Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF; *Journal of Cell Sciences*, n. 111, 237-247.
- Price JE, Polyzos A, Zhang RD and Daniels MD: Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* 50: 717-721, 1990.
- Reitz M.S., Jr., Lata S. Nerurkar, Robert C. Gallo; 1999; Perspective on Kaposi's Sarcoma: Facts, Concepts, and Conjectures; *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, n. 17, 1453-1458.
- Ridley AJ (2001) *Trends Cell Biol.* 11, 471-477
- Sakane F, Imai S, Yamada K, Kanoh H (1991) *Biochem Biophys Res Commun.* 181, 1015-1021
- Sakane F. , Shin-ichi Imaia, Masahiro Kaia, Satoshi Yasudaa, Hideo Kanoh; 2007; Diacylglycerol kinases: Why so many of them?; *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1771, 793-806.
- Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH (55) *Mol Pharmacol* 55, 949-956
- Shaap D., John De Widt, Jose van der Wal, Joel Vendekerckhove, Jose van Damme, Detlef Gussow, Hidde I. Ploegh, Wim J. van Blitterswijk, Rob L. van der Bend, 1990, Purification, cDNA cloning and expression of human diacylglycerol kinase; *FEBS Letters*, vol. 275, n. 1-2, 151-158.
- Sharma G., Jiucheng He, Haydee E. P. Bazan; 2003; p38 and ERK1/2 Coordinate Cellular Migration and Proliferation in Epithelial Wound Healing; *The Journal of Biological Chemistry*; vol. 278, n. 24, 21989-21997.
- Sheikh MS, Garcia M, Pujol P, Fontana JA and Rochefort H: Why are estrogen-receptor-negative breast cancers more aggressive than the estrogen-receptor-positive breast cancers? *Invasion Metastasis* 14: 329-336, 1995.
- Siegal B., Sofia Levinton Kriss, Aaron Schiffer, Joshua Sayar, Isaac Engelberg, Ami Vonsover, Yochanan Ramon, Ethan Rubinstein; 1990, Kaposi's sarcoma in immunosuppression. Possibly the result of a dual viral infection; *Cancer*, n. 65, 492-498.
- Tabellini G, Billi AM, Fala F, Cappellini A, Evagelisti C, Manzoli L, Cocco L, Martelli AM. Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to nerve growth factor stimulation of PC12 cells. *Cell Signal.* 2004 Nov;16(11):1263-71.

- Takeuchi H, Kanematsu T, Misumi Y, Sakane F, Konishi H, Kikkawa U, Watanabe Y, Katan M, Hirata M (1997) *Biochim Biophys Acta*. 1359, 275-285
- Tang W, Bunting M, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (1996) *J Biol Chem*. 271, 10273-10241
- Teoh NC, Farrell GC (2003) *J Gastroenterol Hepatol*. 18, 891-902
- Topham M. K.; 2006; Signaling Roles of Diacylglycerol Kinases; *Journal of Cellular Biochemistry* vol. 97, 474–484.
- Topham MK, Bunting M, Zimmerman GA, McIntyre TM, Blackshear PJ, Prescott SM (1998) *Nature*. 394,697–700
- Tosaki A, Maulik N, Cordis G, Trifan OC, Popescu LM, Das DK (1997) *Am J Physiol*. 273, 1860-1866
- Tu-Sekine B, Ostroski M, Raben D (2007) *Biochem*. 46, 924-932
- van Baal J, de Widt J, Divecha N, van Blitterswijk WJ (2005) *J Biol Chem*. 280, 9870-9878
- Walker AJ, Draeger A, Houssa B, van Blitterswijk WJ, Ohanian V, Ohanian J (2001) *Biochem J*. 353, 129-137
- Weiss R., Chris Boshoff; 2000; Addressing controversies over Kaposi's sarcoma; *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 9, 677-679.
- Yamaguchi Y, Shirai Y, Matsubara T, Sanse K, Kuriyama M, Ohshiro N, Yoshino K, Yonezawa K, Ono Y, Saito N (2006) *J Biol Chem*. 281, 31627-31637
- Yanagisawaa K., Satoshi Yasudab, Masahiro Kaib, Shin-ichi Imaib, Keiko Yamadac, Toshiharu Yamashitaa, Kowichi Jimbowa, Hideo Kanohb, Fumio Sakane; 2007 Diacylglycerol kinase alpha suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of human melanoma cells through NF-kappaB activation; *Biochimica et Biophysica Acta*, n.1771(4), 462-474.
- Yatchi M. Naidu, Eliot M. Rosen, Ralph Zitnick, Itzhak Goldberg, Morag Park, Monica Naujokas, Peter J. Polverini, Brian J. Nickoloff; 1994; Role of Scatter Factor in the pathogenesis of AIDS-related Kaposi sarcoma; *Cell Biology*, vol. 91, 5281-5285.

## **ATTIVITA'FORMATIVA**

### ANNO I

1. Lunedì 27 Settembre 2004, ore 15:30 "Traffico intra- ed extra-cellulare di nucleotidi-segnale attivi nella regolazione del calcio cellulare" Prof. Antonio De Flora
2. 23 Settembre 2004, Relazione annuale dottorati
3. 16 Settembre 2004, Relazione annuale dottorati
4. 7 Luglio 2004, "Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy" Prof. Martin Ronis
5. 5 Luglio 2004, "From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions" Prof. Armando Bartolazzi,
6. 29 giugno 2004, "PI 3-kinase controls cardiac contractility and hypertrophy through kinase-dependent and independent functions" Prof. Emilio Hirsch
7. 11 giugno 2004, "Virus e malattie autoimmuni" Antonio PUCCETTI
8. 20 maggio 2004, "Le artriti croniche del bambino" Alberto MARTINI
9. maggio 2004, "Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS)" Frédéric RIEUX-LAUCAT

### ANNO II

1. 2 dicembre 2004 "repertaxin, un nuovo inibitore di il-8: risultati preclinici e identificazione del meccanismo d'azione" Dr. Riccardo Bertini
2. 11/3/2005 "Proteomica dell'epitelio intestinale" Prof. Margherita Ruoppolo
3. 21/3/2005 "Sclerosi Multipla: ricerca di geni di suscettibilità nella popolazione finlandese." Dr.ssa Rosanna Asselta
4. Mercoledì 6 aprile "toward regulation of gene expression by chromatin modification: some biomedical model" Prof. Gerardo Lopez-Rodas
5. 30 maggio 2005 "Il dolore articolare: un problema clinico o biochimico?" Giampiero Pescarmona
6. 1 giugno 2005 "geni e trapianti" Antonio Amoroso
7. 8 Giugno 2005 "procreazione medicalmente assistita: aspetti medici, biologici e legali"
8. 17 giugno alle 14 "La tossina della pertosse ed il suo B-oligomero: nuovi farmaci immunostimolanti e anti-HIV?" Guido Poli
9. 12 settembre 2005 "caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion" Dr. Ornella Parolini
10. 20 Settembre 2005, Prof. Luca Parente Regolazione dell'apoptosi da parte di glucocorticoidi ed annessina-1

### ANNO III

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

#### ANNO IV

1. Giovedì 19 ottobre 2006 “Stem Cells In Cardiac Pathophysiology And Treatment” Dr. Paolo Di Nardo
2. Mercoledì 10 gennaio 2007 "Gene Silencing by RNA interference (RNAi)" Prof.ssa Paola Defilippi
3. Mercoledì 17 gennaio 2007 "Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions" Prof. Michele Caselle
4. Giovedì 25 gennaio 2007 “Nuovi ruoli per le proteine adattatrici p130CAS e p140CAP nella trasformazione tumorale e nel carcinoma della mammella ” Prof.ssa Paola Defilippi
5. Giovedì 1 febbraio 2007 ”Gene therapy strategies for phenylketonuria” Prof. Beat Thony,
6. Giovedì 22 Febbraio 2007 “Fragile X Syndrome From Rna Metabolism Impairment To Spine Dymorphogenesis” Prof. Claudia Bagni
7. venerdì 16 marzo 2007 ”Drosophila as a Model for Aging and Cancer” Prof. Dirk Bohmann, Ph.D
8. Perkin Elmer “tecniche non radiometriche per lo studio della trasduzione del segnale”
9. “BRET and FRET: new technologies for mapping receptor/G proteins interactions” 30 marzo 2007 Milano
10. 12 aprile 2007 “Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein data base” Dott. Marco Milanese
11. Mercoledì 9 maggio “FGF2: lessons from a prototypic angiogenic growth factor” Prof. Marco Presta
12. 4 giugno "Sindromi autoinfiammatorie". Prof. Martini
13. 27 giugno relazioni finali Dottorato Medicina Molecolare XVIII ciclo



## SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

ANNO I

ANNO II

1. Corso di Inglese (Prof. Colin Bell)
2. Corso di statistica (Prof. Magnani)

ANNO III

ANNO IV

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

### ANNO I

- Ho esposto i risultati delle mie ricerche al 1st Italian RNA interference Symposium, tenutosi il giorno 8 Giugno 2004 a Milano presso IFOM – Istituto FIRC di Oncologia Molecolare.
- Ho esposto i risultati delle mie ricerche all'edizione 2004 della riunione della sezione Liguria-Lombardia-Piemonte della SIB, tenutasi a NOVARA il 14 Maggio 2004.
- Ho partecipato al FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4° Dubrovnik Signaling Conference, tenutosi a Dubrovnik, Croatia, 21-27 Maggio 2004.

### ANNO II

- Sono stato relatore al FEBS Advanced Course on "Lipid-protein interaction in signalling and membrane traffic" 10-15 June 2005, Consorzio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro, Chieti - Italy.
- "Meccanismi di Trasduzione del Segnale in Adesione e Differenziamento Cellulare", presso la Certosa di Pontignano, vicino a Siena dal 18 al 19 marzo 2005
- Riunione della sezione Liguria-Lombardia-Piemonte della SIB, tenutasi a NOVARA il 20 Maggio 2005.
- EMBO Workshop "Invasive Growth: a Genetic Program for Stem Cells, Cancer, and Cancer stem Cells" Third IRCC International Cancer Conference, 26-29 Maggio 2005, Torino.
- "3rd Italian RNA interference Symposium: applications in oncogenetics" Torino, martedì 7 giugno 2005
- "3rd ANNUAL NATIONAL IHUPO CONGRESS 2005" Ospedale Veterinario di Lodi, , 29th september - 1st october

### ANNO III

- Convegno annuale della sezione Ligure-Lombardo-Piemontese della società italiana di biochimica e biologia molecolare, Pavia 19 maggio 2006
- Workshop SIICA-SIC "Angiogenesi: basi molecolari ed implicazioni terapeutiche" CERTOSA DI PONTIGNANO (Siena) 5-7 Giugno 2006
- Congresso SIB 2006 - Riccione 28-30 settembre
- "La proteomica in piemonte acquisizioni e sviluppi nei settori ambientale, clinico e alimentare" Torino, 20 gennaio 2006
- "Lipidi e segnali cellulari" Molini Marzoli Busto Arsizio, venerdì 7 aprile 2006
- Proteine 2006, Novara, 1-3 Giugno, 2006
- 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

#### ANNO IV

- Segnali di calcio in Piemonte; venerdì 2 febbraio 2007, Novara.
- Spring 2007 ABCD and UK Adhesion Society Meeting: "Mechanisms of Signal Transduction in Cell Adhesion and Differentiation" Rome, 30-31 March 2007
- EMBO Conference Series on "Signaling in the immune system" Lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling; Siena 24-28 May 2007
- "Molecular Determinants of Cell Signalling", Torino 25-27 Giugno 2007
- Sono stato relatore a "Phosphorylation, Signaling & Disease" May 16 - 20, 2007, Cold Spring Harbor Laboratory (NY)

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

#### *A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)*

#### ANNO I

- Comunicazione orale "New tool for  $\alpha$ -DGK inhibition" 1st Italian RNA interference Symposium, tenutosi il giorno 8 Giugno 2004 a Milano presso IFOM – Istituto FIRC di Oncologia Molecolare.
- Comunicazione orale "Diacylglycerol Kinase A Is Required For *In Vitro* Angiogenesis" Riunione della sezione Liguria-Lombardia-Piemonte della SIB, tenutasi a NOVARA il 14 Maggio 2004.
- Poster "HGF- and V-SRC-INDUCED ACTIVATION of  $\alpha$ Diacylglycerol Kinase Are Required For Epithelial-Mesenchymal Transition" FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference - Cavtat (Croatia) 2004

#### ANNO II

- Comunicazione orale "Src Control Of Diacylglycerol Kinase  $\alpha$  Activity And Localization" al FEBS Advanced Course on "Lipid-protein interaction in signalling and membrane traffic" 10-15 June 2005, Consorzio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro, Chieti - Italy.
- Poster "Activation and membrane recruitment of Dgk- $\alpha$  by Src-mediated phosphorylation of tyrosine 335 are necessary and sufficient for cell motility" al EMBO Workshop "Invasive Growth: a Genetic Program for Stem Cells, Cancer, and Cancer stem Cells" Third IRCC International Cancer Conference, 26-29 Maggio 2005, Torino.

#### ANNO III

- Comunicazione orale "Sap And Dgk- $\alpha$ : Their Interaction And Role In Immunity" Convegno annuale della sezione Ligure-Lombardo-Piemontese della società italiana di biochimica e biologia molecolare, Pavia 19 maggio 2006
- Comunicazione orale "Diacylglycerol kinase alfa is required for in vitro angiogenesis" Workshop SIICA-SIC "Angiogenesi: basi molecolari ed implicazioni terapeutiche" CERTOSA DI PONTIGNANO (Siena) 5-7 Giugno 2006
- Comunicazione orale "Diacylglycerol kinase regulates Rac activation and HGF invasion" Congresso SIB 2006 - Riccione 28-30 settembre

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

#### ANNO IV

- Poster "Diacylglycerol kinase  $\alpha$  is a novel interactor and effector of SAP during T cell activation. A possible pharmacological target for XLP treatment?" EMBO Conference Series on

“Signaling in the immune system” Lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling; Siena 24-28 May 2007

- Comunicazione orale “Diacylglycerol kinase- $\alpha$  mediates HGF-induced cell scattering, by regulating Rac membrane targeting and activation” “Phosphorylation, Signaling & Disease” May 16 - 20, 2007, Cold Spring Harbor Laboratory (NY)

### *B) Altre comunicazioni*

#### ANNO I

- ANBI 2004 - Villa Gualino, Torino “Diacylglicerolo Cinasi- $\alpha$  ( $\alpha$ Dgk) E Fosfatidilinositolo-4-Fosfato 5-Cinasi (Pi4p-5k): Progetto Per Lo Studio Di Un Possibile Crosstalk.”
- ANBI 2004 - Villa Gualino, Torino “Studio Del Coinvolgimento Di Grelina Nel Differenziamento Muscolare”
- FISV 2004 - Palacongressi, Riva del Garda “Diacylglycerol Kinase-Alpha Is Involved In Regulation Of Cell Adhesion To Extracellular Matrix”
- FISV 2004 - Palacongressi, Riva del Garda “Proteomic Analysis Of  $\alpha$ - Diacylglycerol Kinase Associated Proteins And Effectors”
- SIC "XLVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia" - Pisa 2004 “Diacylglycerol Kinase- Alpha Is Involved In Hgf-Induced Invasion Of Mammary Cells”
- Workshop Molecular advances in DAG signaling - Madrid (Spain) 2004 “Mechanism Of Activation And Role Of Alpha-Diacylglycerol Kinase In Hgf Signaling In Epithelial Cells.”
- BioScience2004, from molecules to organisms - Glasgow (Scozia) 15-17 novembre 2004 “ $\alpha$ Diacylglycerol Kinase Is A Potential Target For Angiogenesis And Metastasis Control”
- EMBO workshop Lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling - Certosa di Pontignano, Siena 11-15 settembre 2004 “ $\alpha$ -Diacylglycerol Kinase Is Activated By Src And Growth Factors Through Tyrosine Phosphorylation”
- ABCD 2004, Hotel Farnese, Roma “Hgf- And V-Src-Induced Activation Of Diacylglycerol Kinase- $\alpha$ Are Required For Epithelial-Mesenchymal Transition.”

#### ANNO II

- “Diacylglycerol kinase- $\alpha$  regulates HGF-induced epithelial cell motility by acting on focal complexes assembly and RAC1 localization and activation” Convegno Annuale SIB Sezione Ligure-Lombardo-Piemontese. Novara, 20 maggio 2005.
- “Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular system: an in vitro study and in vivo perspectives.” CNB8: 8th national biotechnology congress, Siena 7-9 settembre 2005.
- “ShRNA for a constitutive knock down of diacylglycerol kinase alpha expression.” CNB8: 8th national biotechnology congress, Siena 7-9 settembre 2005.
- “Role of Diacylglycerol Kinase Alpha in EGF receptor regulation.” FISV 2005, Riva del Garda 22-25 settembre 2005
- “Alpha Dgk regulates HGF-induced epithelial cell motility by acting on focal complexes and Rac1 localization and activation.” FISV 2005, Riva del Garda 22-25 settembre 2005
- “ShRNA for a constitutive knock-down of Diacylglycerol kinase alpha expression.” Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli
- “Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular systems: an in vitro study and in vivo perspectives.” Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.
- “Role of Diacylglycerol Kinase  $\alpha$  in EGF receptor regulation.” Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.

- “Role of ghrelin in skeletal muscle differentiation and hypertrophy: characterization of its biologic activity in vitro; identification of the receptor and in vivo patho-physiological implication.” Comitato Telethon Fondazione Onlus - Scientific Convention. Salsomaggiore Terme, Marzo 6-8, 2005
- “Role of Diacylglycerol Kinase  $\alpha$  in RGF receptor regulation.” ABCD 2005 - Certosa di Pontignano (Siena), Marzo, 2005
- “Diacylglycerol Kinase- $\alpha$  Regulates Hgf-Induced Epithelial Cell Motility By Acting On Focal Complexes Assembly And Rac1 Localization And Activation.” ABCD 2005 - Certosa di Pontignano (Siena), Marzo, 2005
- IIX Congresso nazionale CIB 7-9 settembre 2005 Siena  
 “Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular systems: an in vitro study and in vivo perspectives”  
 “ShRNA for a constitutive Knock-down of Diacylglycerol kinase  $\alpha$  expression”

### ANNO III

- FISV 2006 – Riva del Garda (TN), 28 settembre – 1 ottobre 2006  
 “Development Of A New Tool To Study The Role Of Diacylglycerol Kinase Alpha In Tumor Progression.”  
 “Ghrelin Induces Differentiation And Fusion Of C2c12 Myoblasts And Protects Myotubes From Atrophy.”
- SIB 2006, 28-30 September 2006, Riccione  
 “Diacylglycerol kinase  $\alpha$  regulates RAC activation and HGF invasion”  
 “Ghrelin induces differenziation and fusion of C2C12 myoblasts and protects myotubes from atrophy”  
**The Italian Journal of Biochemistry** vol. 55 (2006) pagine 43 e 160
- Congresso Nazionale delle Biotecnologie CNB9 – Torino, 4-8 settembre 2006  
 “DGK- $\alpha$  regulates HGF- induced cell motility through RAC”  
 “Ghrelin induces differenziation and fusion of C2C12 myoblasts and protects myotubes from atrophy”
- 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 Recriutment And Hgf-Induced Cell Motility.”
- FEBS Special Meeting – Cellular Signaling - Dubrovnik (Croatia), May 26 - June 1 2006  
 “ShRNA To Study The Role Of Diacylglycerol Kinase Alpha In Tumorigenesis.”
- BRESCOM Brest Cancer and Metastasis Meeting – Institute Curie, Paris, France, 22-24 giugno 2006.  
 “Activation And Membrane Recruitment Of  $\square$ Dgk Are Mediated By Src-Dependent Phosphorylation Of Tyrosine 335 And Are Required For Hgf-Induced Rac Activation And Cell Migration”
- Proteine 2006, 1-3 Giugno 2006, Novara  
 “DGK- $\alpha$  phosphorylation by Src is required for activation, membrane recruitment and HGF induced cell motility”  
 “Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular systems: an in vitro study and in vivo perspectives”  
 “Dgk- $\alpha$  Regulates Hgf And V-Src –Induced Cell Motility Through Paxillin And Rac.”
- 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver April 26 - 30, 2006, Vienna, Austria

“The Stimulation Of Purinergic P2y Receptors Promotes Hepatocyte Preconditioning Via A Src And P38 Map Kinase-Dependent Mechanism”

**Journal of Hepatology**, volume 44, supplement 2 (2006) pagina S53

#### ANNO IV

- FEBS workshop “Invadopodia, Podosomes and Focal Adhesions in Tissue Invasion” – Ortona, 8-13 settembre 2007.

“Dgk $\alpha$  Mediates Hgf-Induced Epithelial Cell Migration, By Regulating Ruffle Formation And Rac Activation, And Represents A Good Candidate For Regulation Of Tumor Progression.”

- Molecular Determinants of Cell Signaling, Terzo Seminario Nazionale SIBBM – Torino, 25-26 giugno 2007.

“Hgf-Induced Biological Effects In Kaposi’s Sarcoma Cells Depend On Alpha-Diacylglycerol Kinase.”

- ABCD and UK Adhesion Society Meeting “Mechanisms of Signal Transduction in Cell Adhesion and Differentiation” – Roma 30-31 marzo 2007.

“Diacylglycerol Kinase-Alpha Mediates Hgf-Induced Cell Scattering By Regulating Rac Membrane Targeting And Activation.”

- Keystone Symposia “Molecular Target of Cancer” – Whistler Resort, Whistler, British Columbia, 18-23 marzo 2007

“Development Of A New Tool To Study The Role Of Diacylglycerol Kinase Alpha In Tumour Progression.”

- Phosphoinositides on the Slope – Fara San Martino (Chieti), 17-20 marzo 2007.

“Dgk Mediates Hgf- And V-Src-Induced Cell Scattering By Regulating Rac Activation And Paxillin-Containing Focal Adhesion Reorganization.”

- Phosphoinositides on the Slope – Fara San Martino (Chieti), 17-20 marzo 2007.

“Diacylglycerol Kinase- $\alpha$  Phosphorylation By Src On Tyr335 Is Required For Activation, Membrane Recruitment And Hgf-Induced Cell Motility.”

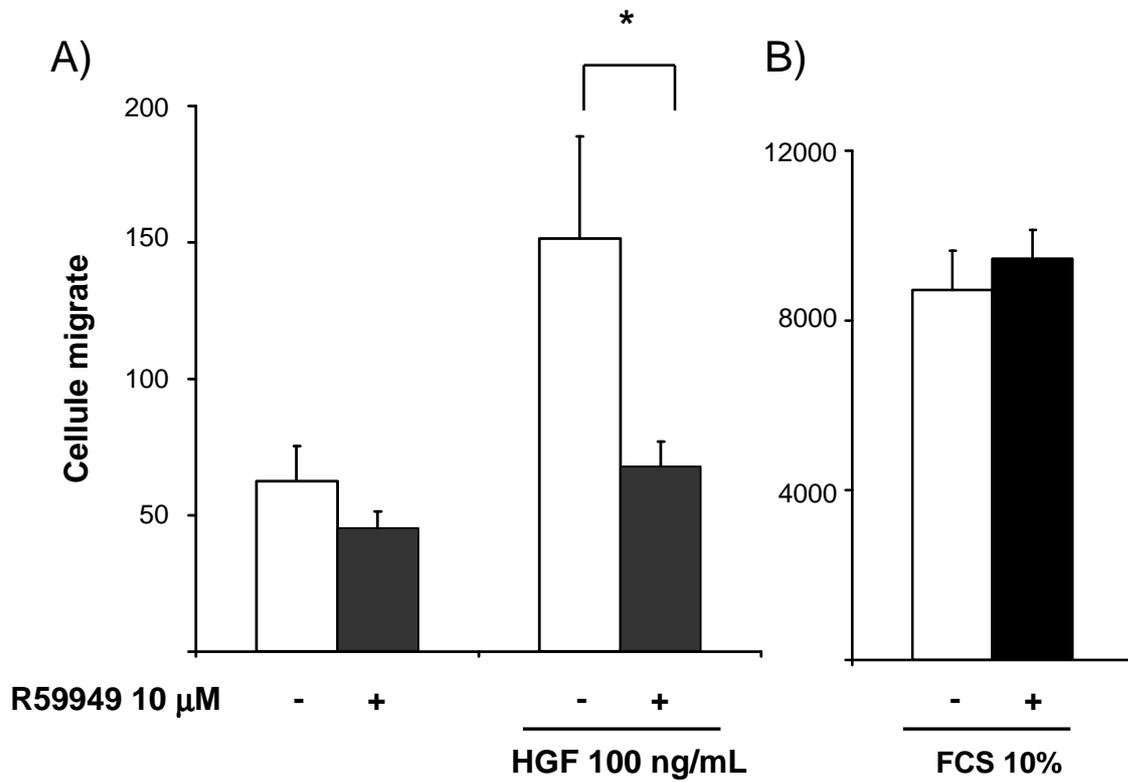
- Thelethon Scientific Convention – Salsomaggiore Terme (PR), 12-14 marzo 2007

“Role Of Ghrelin In Skeletal Muscle Differentiation And Hypertrophy: Characterization Of Its Of Its Biological Activity In Vitro, Identification Of The Receptor And In Vivo Patho-Physiological Implication.”

#### ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

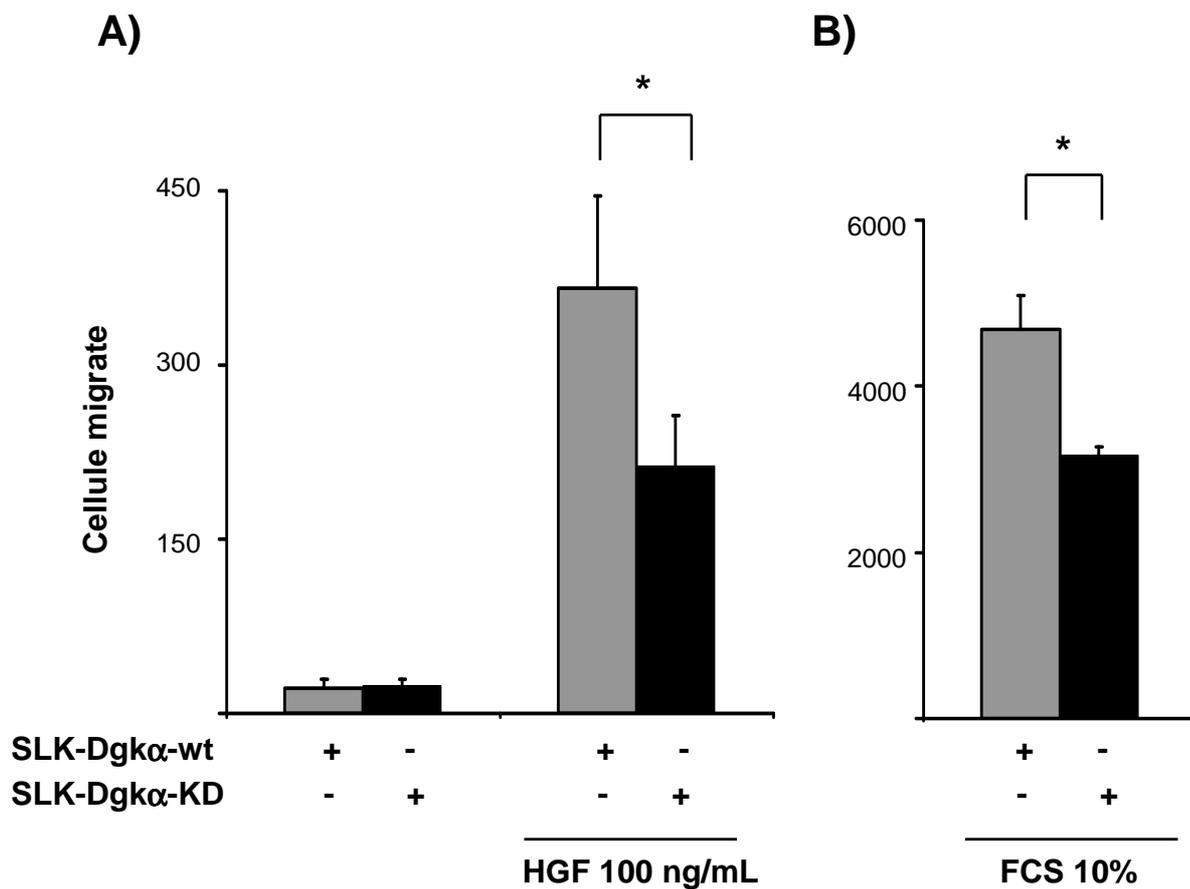
- F. Chianale, S. Cutrupi, E. Rainero, G. Baldanzi, P.E. Porporato, S. Traini, N. Filigheddu, V.F. Gnocchi, M.M. Santoro, O. Parolini, Wim J. van Blitterswijk, F. Sinigaglia and A. Graziani  
Diacylglycerol kinase- $\alpha$  mediates HGF-induced epithelial cell scatter by regulating Rac activation and membrane ruffling  
Mol Biol Cell. in press 2007 IF 6,52
- Baldanzi G, Cutrupi S, Chianale F, Gnocchi V, Rainero E, Porporato P, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Parolini O, Bussolino F, Sinigaglia F, Graziani A.  
Diacylglycerol kinase-alpha phosphorylation by Src on Y335 is required for activation, membrane recruitment and Hgf-induced cell motility.  
Oncogene. in press 2007 IF 6,582
- Filigheddu N, Cutrupi S, Porporato PE, Riboni F, Baldanzi G, Chianale F, Fortina E, Piantanida P, De Bortoli M, Vacca G, Graziani A, Surico N.  
Diacylglycerol kinase is required for HGF-induced invasiveness and anchorage-independent growth of MDA-MB-231 breast cancer cells.  
Anticancer Research. 27(2007):1489-1492. IF 1,479

- N. Filigheddu, V.F. Gnocchi, M. Coscia, M. Cappelli, P.E. Porporato, R. Taulli, S. Traini, G. Baldanzi, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Arnoletti, C. Ghè, A. Fubini, N. Surico, F. Sinigaglia, C. Ponzetto, G. Muccioli, T. Crepaldi, A. Graziani  
Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of c2c12 skeletal muscle cells.  
Molecular Biology of the Cell 18(2007):986-994 IF 6,52
- R. Carini, E. Alchera, G. Baldanzi, D. Piranda, R. Splendore, M.G. De Cesaris, P. Caraceni, A. Graziani, E. Albano  
Role of p38 map kinase in glycine-induced hepatocyte resistance to hypoxic injury  
Journal of Hepatology 46 (2007):692-699. IF 4.93
- Carini R, Alchera E, De Cesaris MG, Splendore R, Piranda D, Baldanzi G, Albano E.  
Purinergic P2Y(2) receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia.  
Journal of Hepatology 45 (2006) 236–245 IF 4.93
- R. Bacchiocchi, G. Baldanzi, D. Carbonari, C. Capomagi, E. Colombo, W.J. van Blitterswijk, A. Graziani and F. Fazioli  
Activation of  $\alpha$ -diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of Anaplastic Lymphoma Kinase.  
Blood 2005 Sep 15;106(6):2175-82 IF 10,13
- R. Carini, M.G. De Cesaris, R. Splendore, G. Baldanzi, M.P. Nitti, E. Alchera, N. Filigheddu, C. Domenicotti, M. A. Pronzato, A. Graziani and E. Albano  
Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning  
Gastroenterology 2004 Sep;127(3):914-23 IF 12,39
- G. Baldanzi, S. Mitola, S. Cutrupi, N. Filigheddu, W.J. van Blitterswijk, F. Sinigaglia, F. Bussolino, A. Graziani  
Activation of diacylglycerol kinase  $\alpha$  is required for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro  
Oncogene 2004 Jun 17;23(28):4828-38 IF 6,872



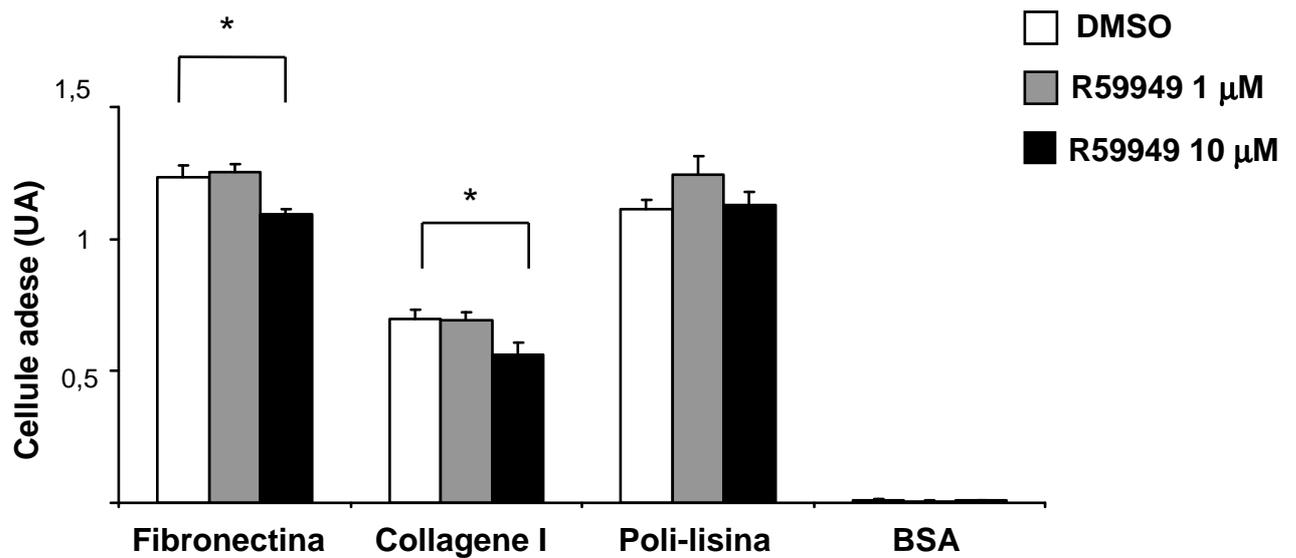
**Fig. 1. R59949 inibisce la chemiotassi indotta da HGF in cellule SLK.**

Migrazione di cellule SLK in risposta ad HGF 100 ng/mL (A) o siero 10% (B) in presenza od assenza di R59949 10  $\mu$ M per 18 ore. I valori sono medie di sei replicati + errore standard; \* = test T  $p < 0,05$  .



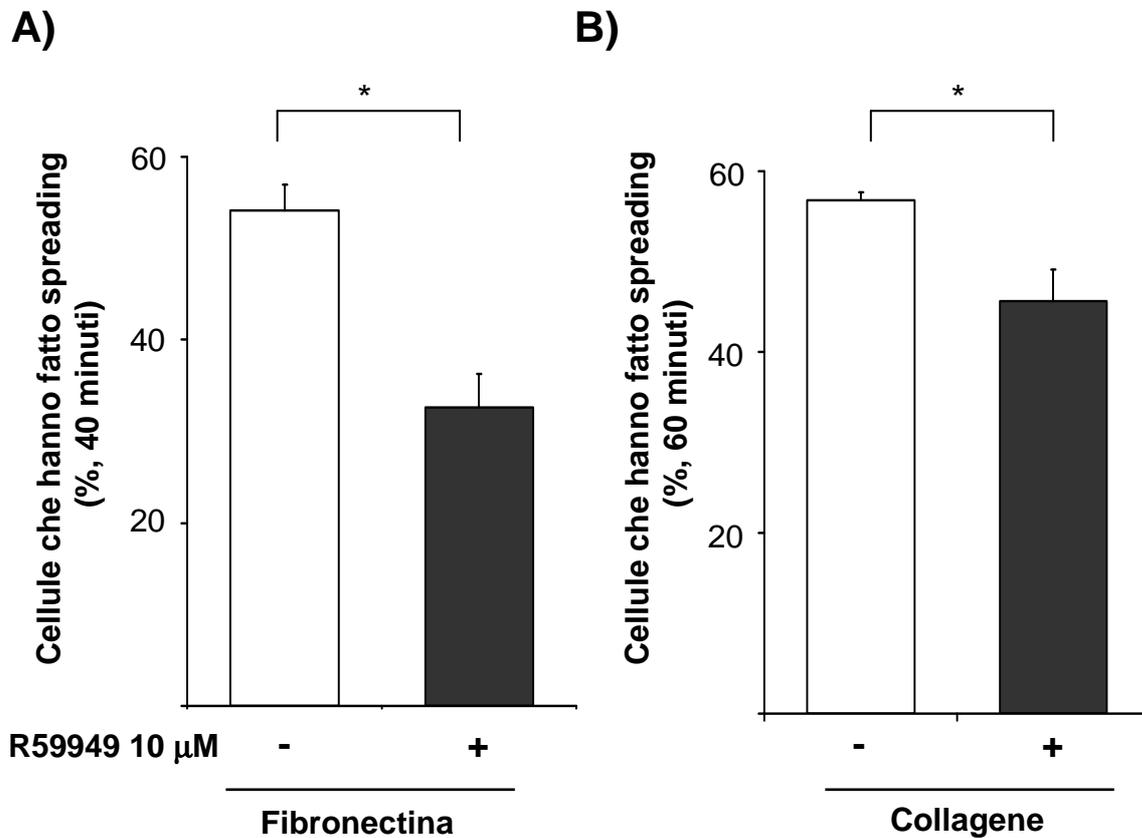
**Fig. 2. Dgk $\alpha$ -KD inibisce la chemiotassi in cellule SLK.**

Migrazione di cellule SLK-Dgk $\alpha$ -wt (colonne grigie) ed SLK-Dgk $\alpha$ -KD (colonne nere) in risposta ad HGF 100 ng/mL (A) o siero 10% (B) per 18 ore. I valori sono medie di sei replicati + errore standard, \* = test T p < 0,05.



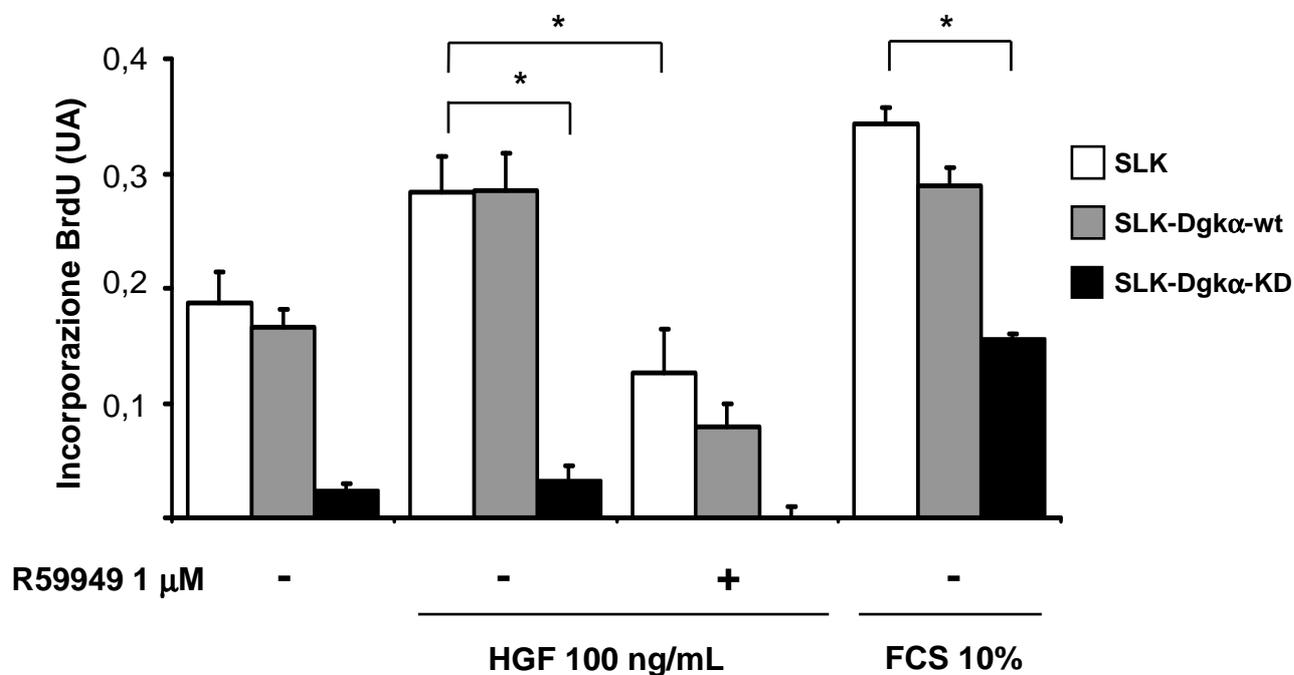
**Fig. 3. R59949 inibisce l'adesione di cellule SLK a fibronectina e collagene.**

Cellule SLK sono state fatte aderire alle matrici indicate per 45 minuti in assenza di siero e in presenza od assenza di R59949. Le cellule non adese sono state rimosse con tre lavaggi in PBS e le cellule adese sono state fissate e colorate con cristalvioletto. Le cellule colorate sono state quantificate disciogliendo il colorante in DMSO e misurando l'assorbanza a 570 nm. I dati sono medie di quattro replicati + errore standard; \* = test T  $p < 0,05$ .



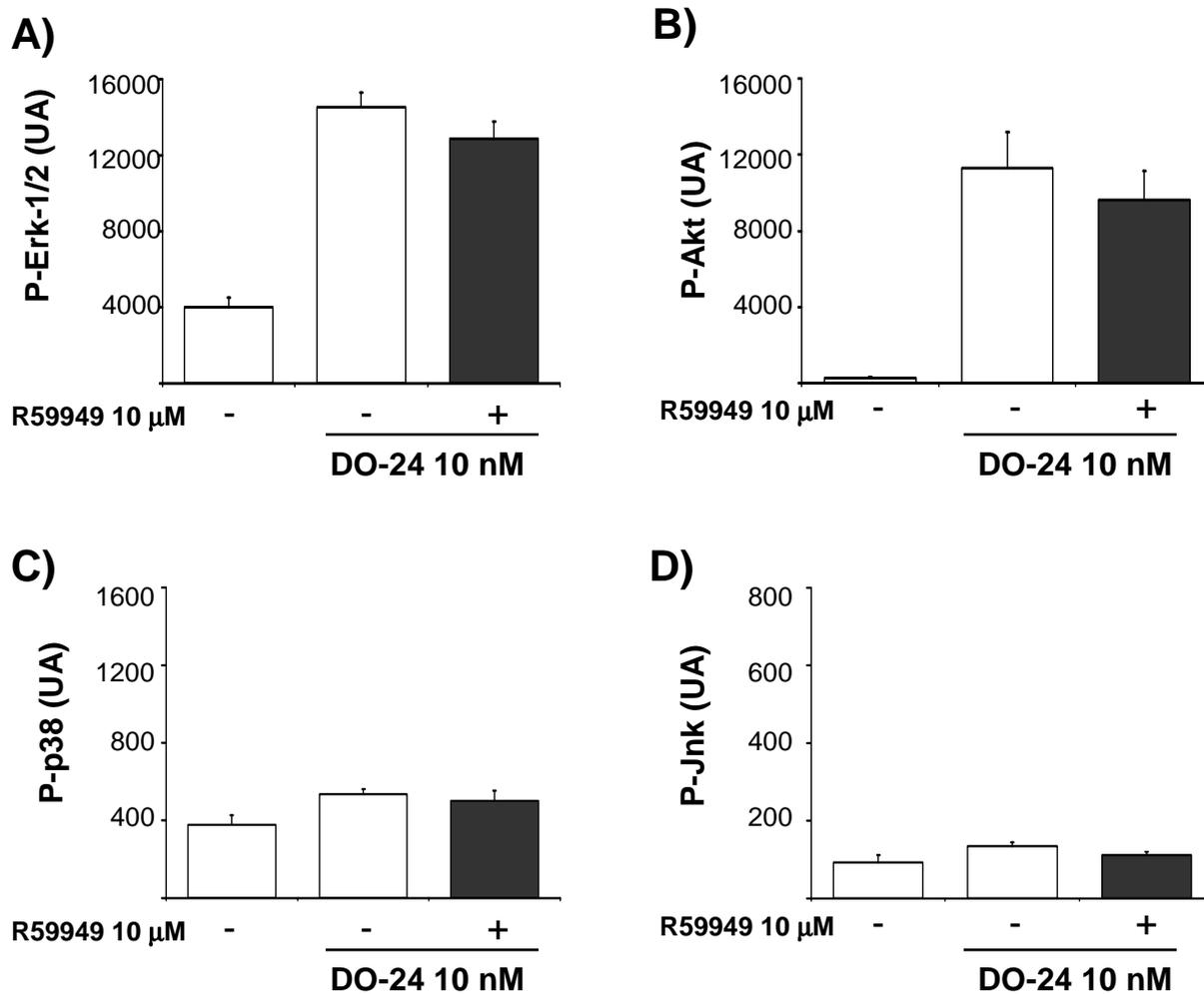
**Fig. 4. R59949 inibisce lo spreading di cellule SLK su fibronectina e collagene.**

Cellule SLK lasciate aderire su pozzetti ricoperti da fibronectina (A) per 40 minuti o su pozzetti ricoperti da collagene (B) per 60 minuti con o senza R59949 10  $\mu$ M. La percentuale di cellule che hanno fatto spreading è stata determinata tramite conta in contrasto di fase (obiettivo 20X). I risultati sono espressi come media di triplicati + errore standard, \* = test T  $p < 0,05$ .



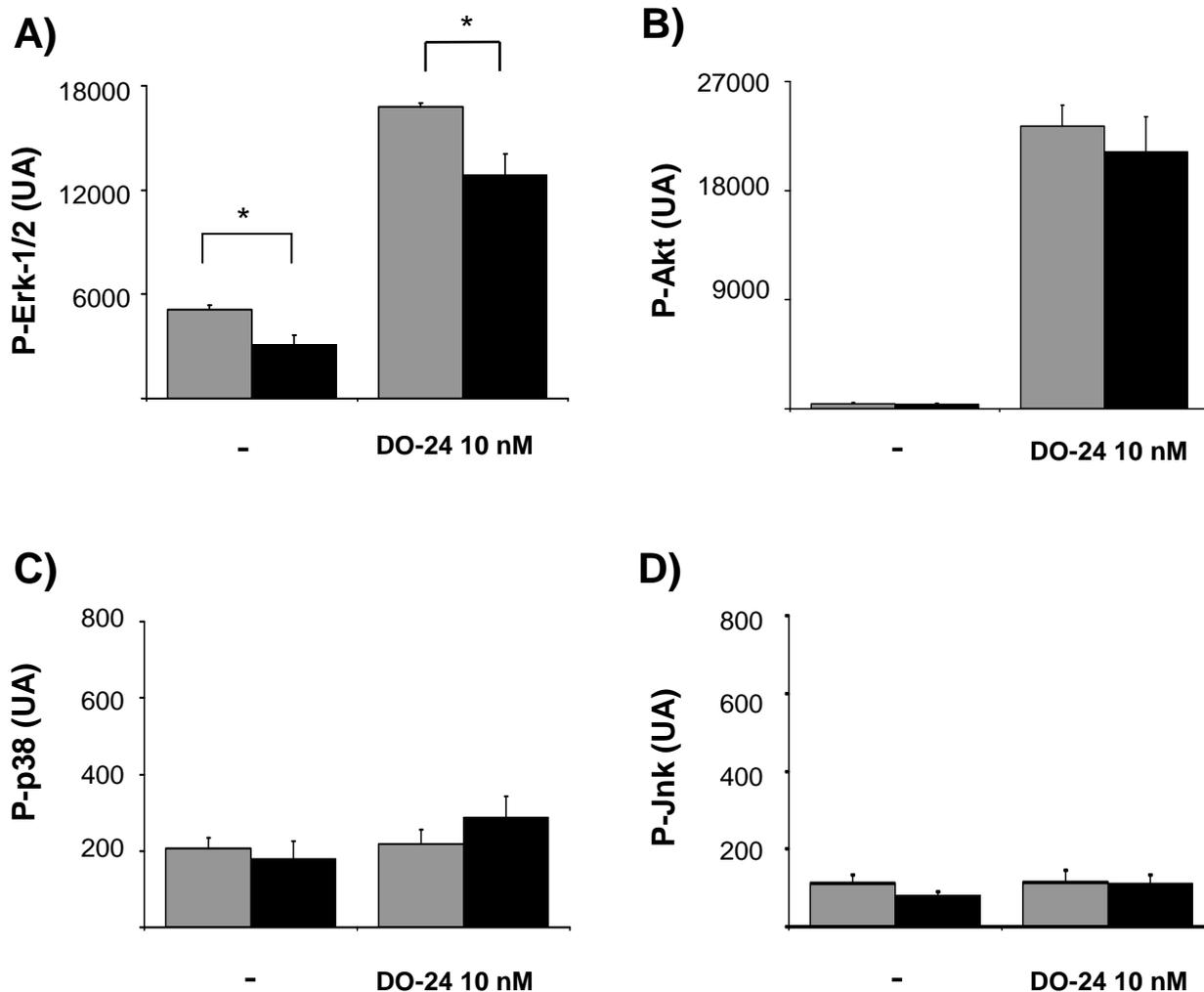
**Fig. 5. L'attività di Dgkα è necessaria per la proliferazione di cellule SLK.**

Cellule SLK ( □ ), SLK-Dgkα-wt ( ■ ) ed SLK-Dgkα-KD ( ■ ) sono state fatte aderire per 18 ore in presenza di siero. Successivamente le cellule sono state mantenute per 30 ore in terreno senza siero addizionato di HGF (100 ng/ml) o Siero 10% e in presenza od assenza di R59949 1 μM. Nelle ultime 6 ore le cellule sono state marcate con BrdU e successivamente l'incorporazione di BrdU nelle cellule proliferanti è stata quantificata con un saggio immunoenzimatico (cell proliferation biotrak ELISA system, Amersham). I dati sono medie di quattro replicati + errore standard. \* = test T  $p < 0,05$



**Fig. 6. Effetti di R59949 sulla trasduzione del segnale di HGFR.**

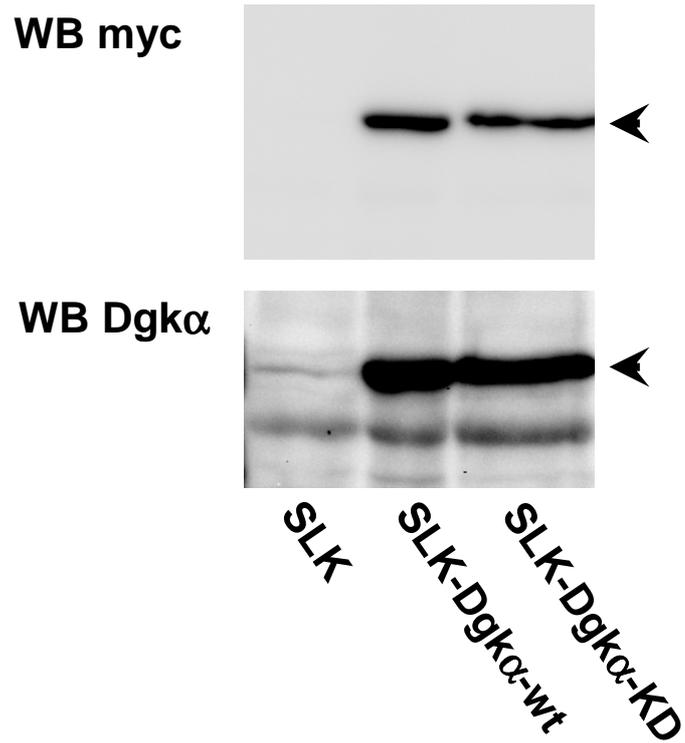
Cellule SLK sono state trattate con o senza R59949 10  $\mu$ M per 30 minuti e successivamente incubate o meno con l'anticorpo agonista di HGFR DO-24 (10 nm per 30 minuti). Le cellule sono state lisate e dopo aver portato tutti i campioni alla concentrazione proteica di 1,2  $\mu$ g/ $\mu$ L la fosforilazione di ERK 1/2 (A), Akt (B), p-38 (C), Jnk (D) è stata misurata con il metodo bioplex. I dati sono medie di triplicati + errore standard. \* = test T P < 0,05.



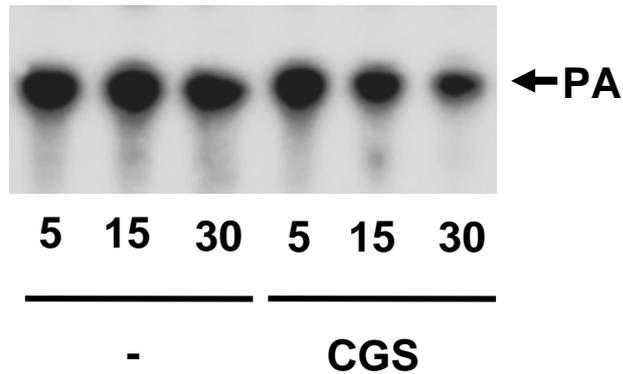
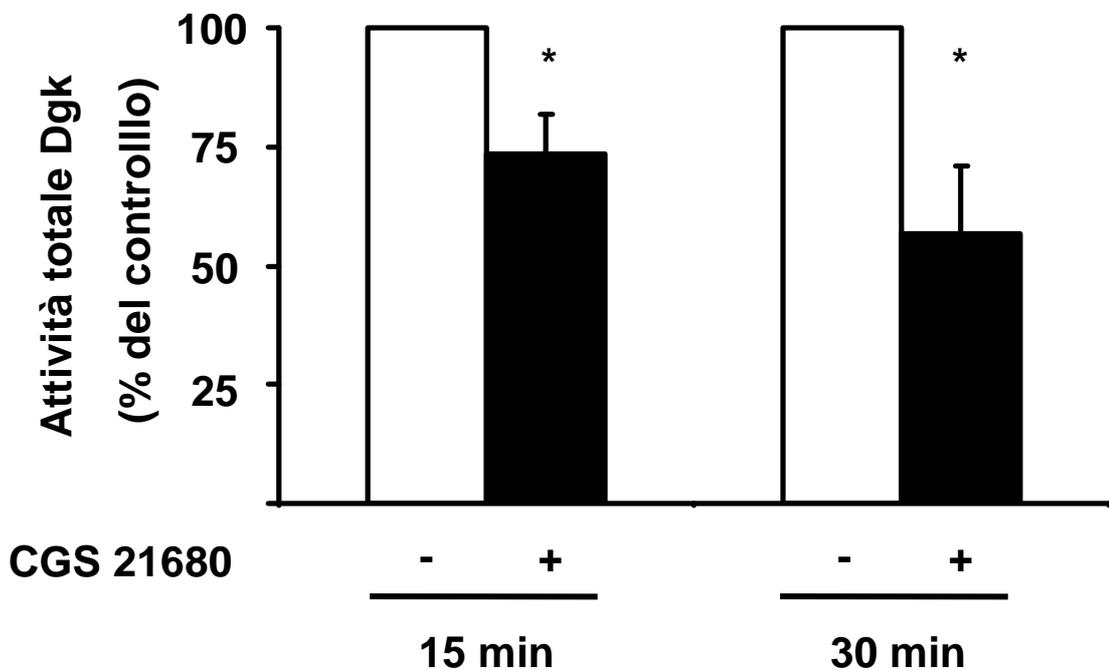
**Fig. 7. Effetti di Dgk-a KD sulla trasduzione del segnale di HGFR.**

Cellule SLK-Dgk $\alpha$ -wt (■) ed SLK-Dgk $\alpha$ -KD (■) sono state trattate con l'anticorpo agonista di HGFR DO-24 (10 nM per 30 minuti). Le cellule sono state lisate e dopo aver portato tutti i campioni alla concentrazione proteica di 1,2  $\mu$ g/ $\mu$ l la fosforilazione di ERK 1/2 (A), Akt (B), p-38 (C), Jnk (D) è stata misurata con il metodo bio-plex. I dati sono medie di triplicati + errore standard. \* = test T P < 0,05.

	SLK	SLK-Dgk $\alpha$ -wt	SLK-Dgk $\alpha$ -KD
HIV p24	-	-	-
HIV gag	-	-	-
GFP (% cellule positive)	0	98	98

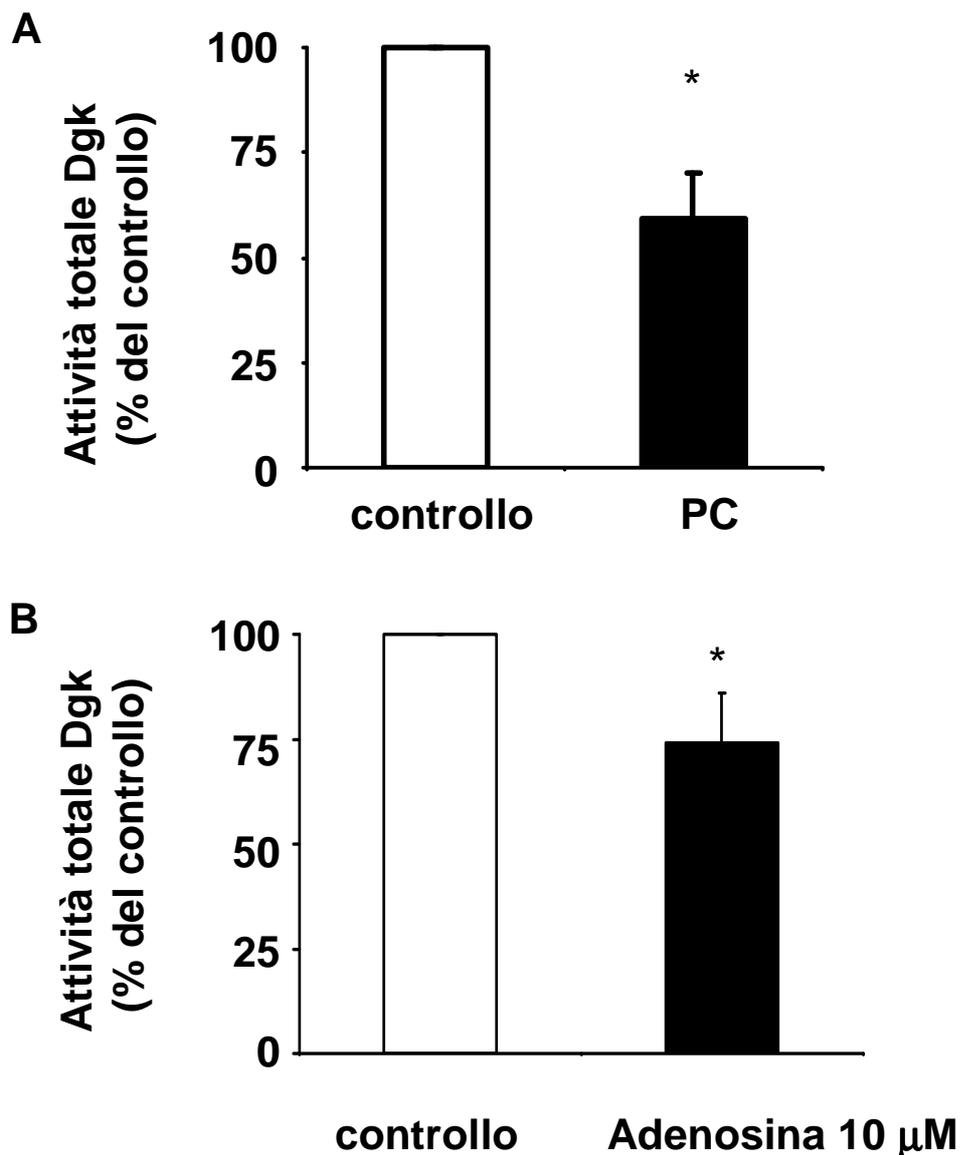


**Fig. 8.** Caratterizzazione delle linee cellulari di SLK

**A****B**

**Fig. 9 Il trattamento con CGS 21680, agonista selettivo dei recettori purinergici A<sub>2</sub>, inibisce l'attività DGK di epatociti primari.**

Epatociti primari di ratto sono stati trattati per i tempi indicati con CGS 21680 1  $\mu$ M ed omogenati. L'attività Dgk totale è stata misurata in vitro con substrati esogeni. Nel pannello **A** viene mostrato un esperimento rappresentativo mentre in **B** viene mostrata la quantificazione di tre esperimenti indipendenti normalizzati per il controllo (\* = test t  $p < 0,05$ ).

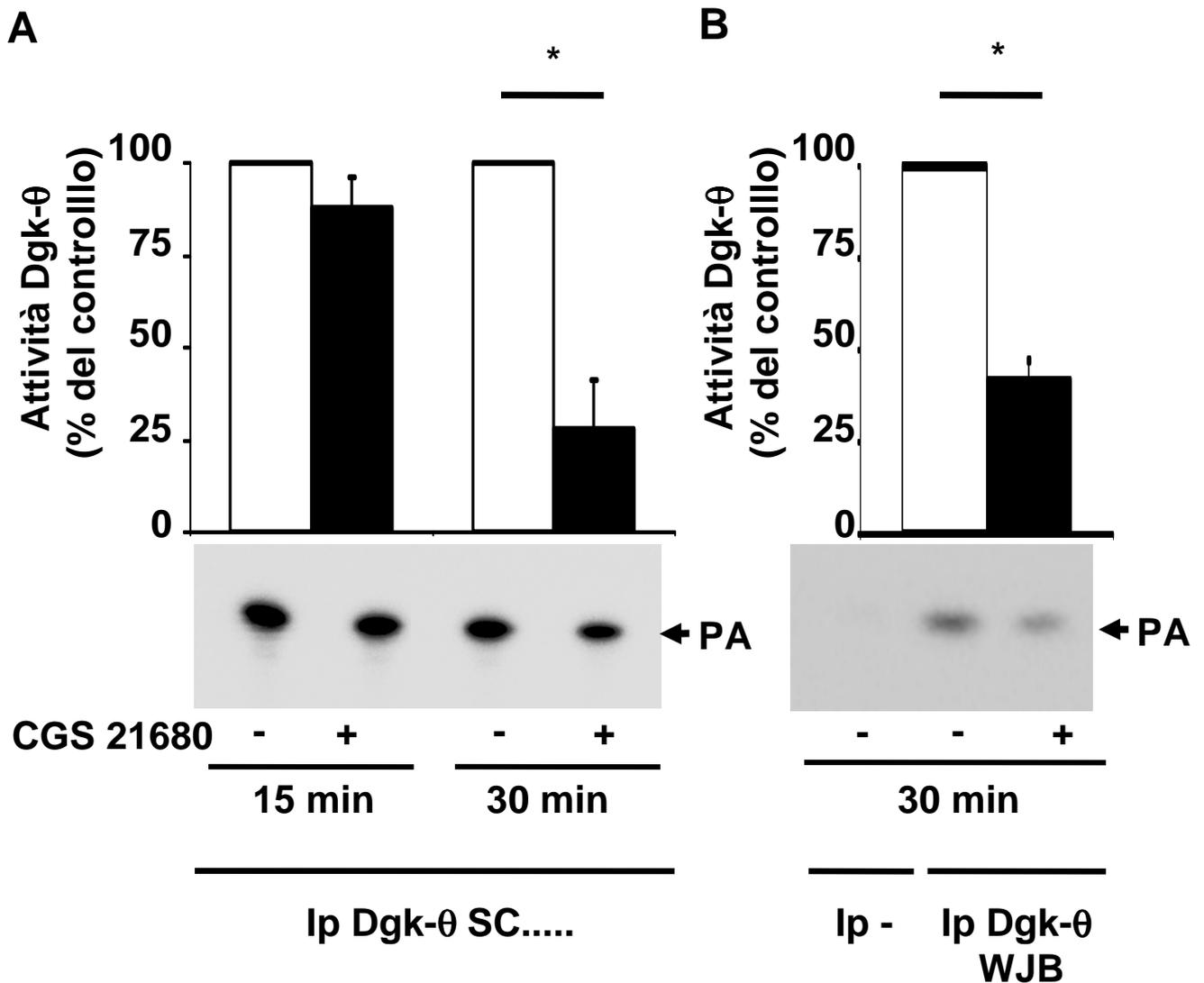


**Fig. 10** Sia il preconditionamento ipossico sia l'adenosina inibiscono l'attività Dgk di epatociti primari.

Attività Dgk totale misurata in vitro con substrati esogeni di epatociti primari di ratto:

**(A)** pretrattati con 10 minuti di ipossia, tre esperimenti normalizzati per il controllo (\* = test t  $p < 0,05$ );

**(B)** trattati con adenosina 10  $\mu$ M per 15 minuti, quattro esperimenti normalizzati per il controllo (\* = test t  $p < 0,05$ ).



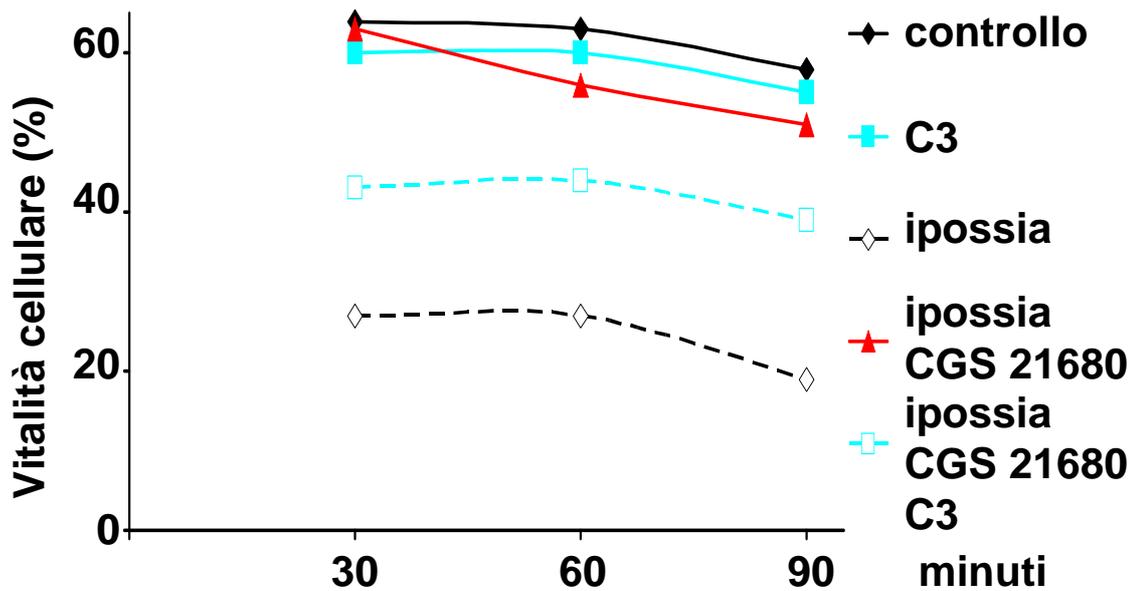
**Fig. 11 Il trattamento con CGS 21680, agonista selettivo dei recettori purinergici A2, inibisce Dgk-θ.**

Epatociti primari di ratto sono stati trattati per i tempi indicati con CGS 21680 1  $\mu$ M e lisati.

**A)** Dgk-θ è stata immunoprecipitata con l'anticorpo SC.... e la sua attività misurata in vitro con substati esogeni. Viene mostrato un esperimento rappresentativo e la quantificazione di tre esperimenti indipendenti (\* = test t  $p < 0,05$ ).

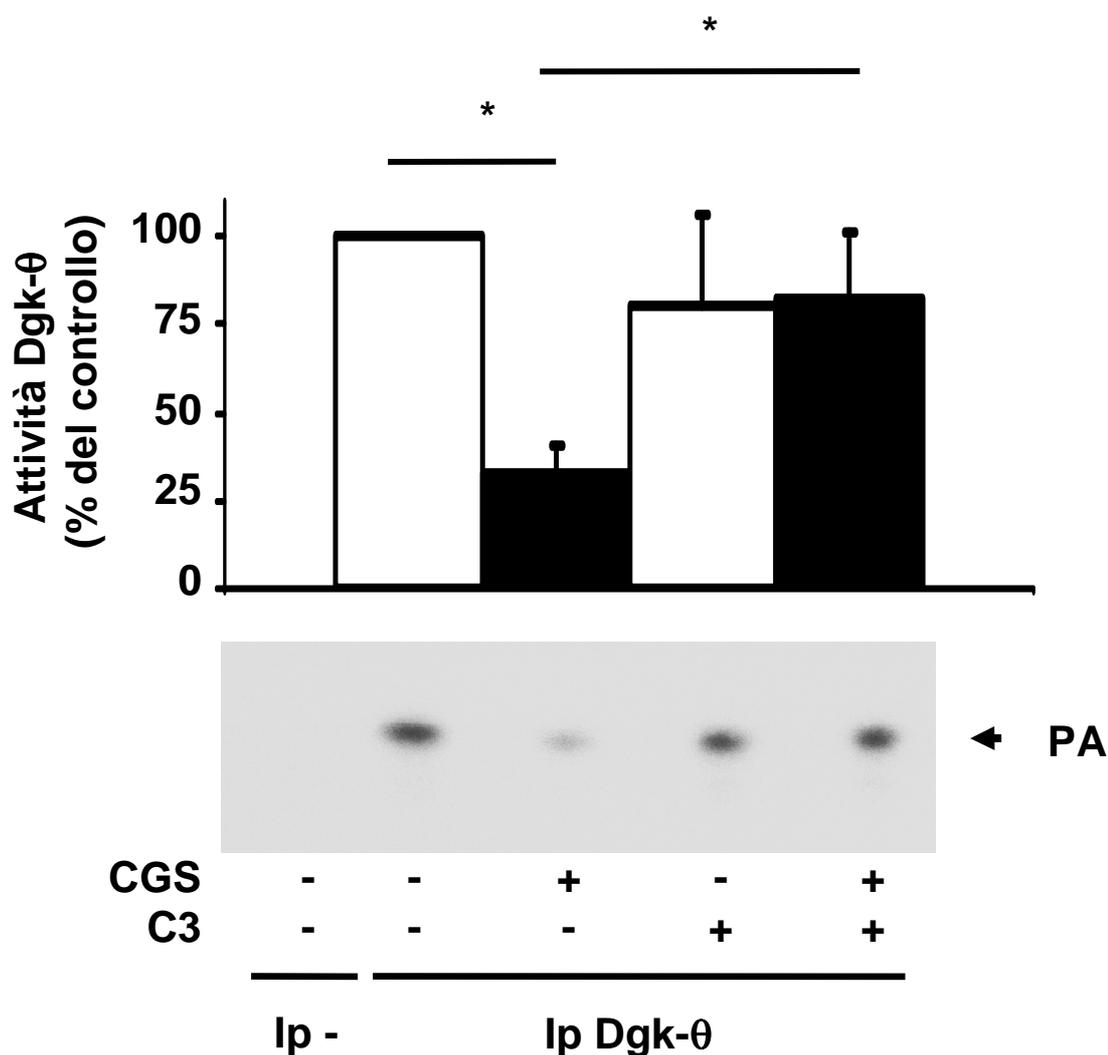
**B)** Dgk-θ è stata immunoprecipitata con l'anticorpo ..... e la sua attività misurata in vitro con substati esogeni, Viene mostrato un esperimento rappresentativo e la quantificazione di tre esperimenti indipendenti (\* = test t  $p < 0,05$ ).





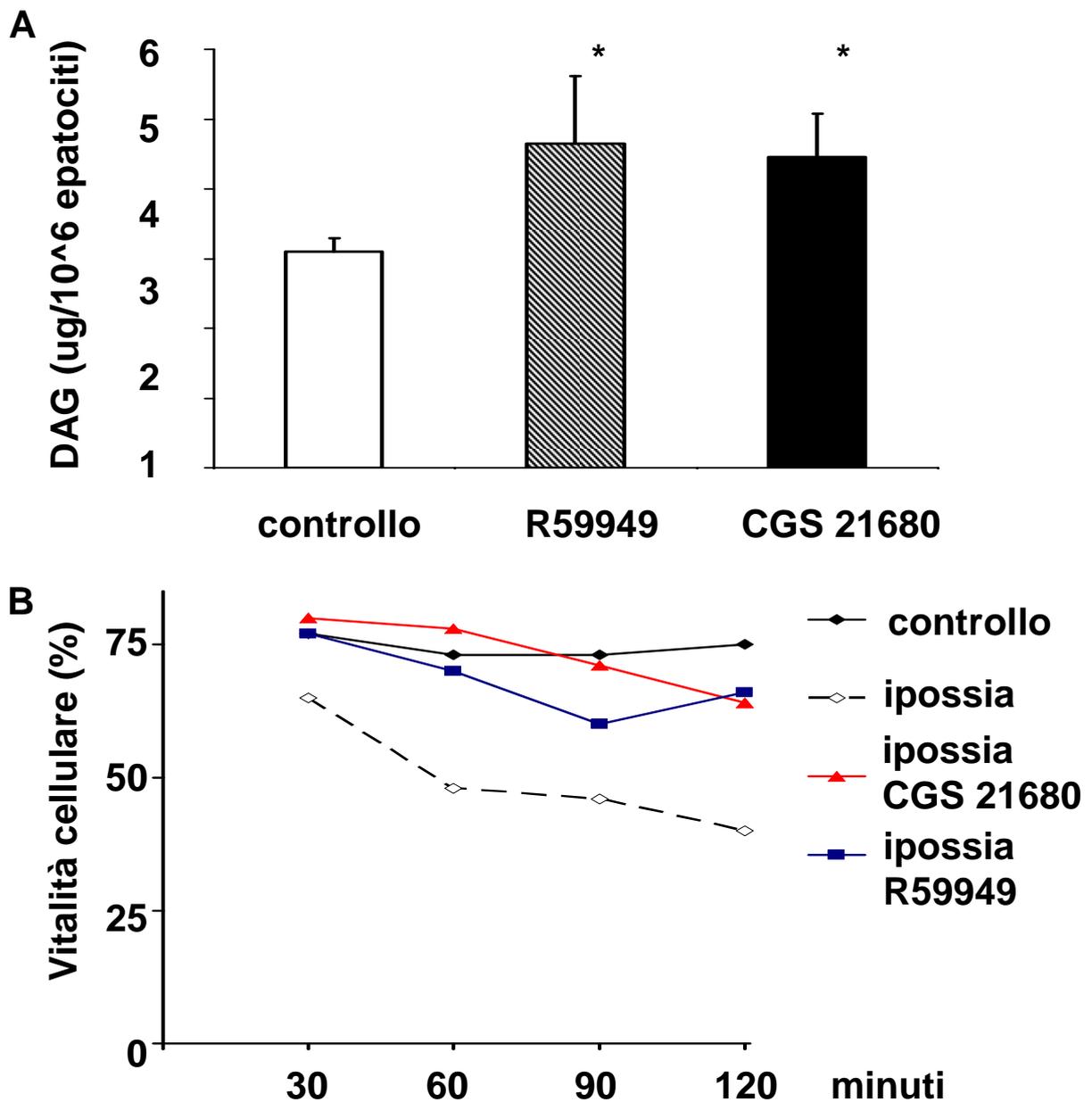
**Fig. 13 L'inibizione di Rho con la trasferasi C3 blocca l'azione citoprotettiva di CGS 21680.**

Vitalità cellulare di epatociti controllo o mantenuti in ipossia per i tempi indicati in presenza od assenza di CGS 21680 1  $\mu$ M o C3 1  $\mu$ M o entrambi.



**Fig. 14 L'inibizione di Dgk-θ, indotta da CGS 21680, è mediata da RhoA**

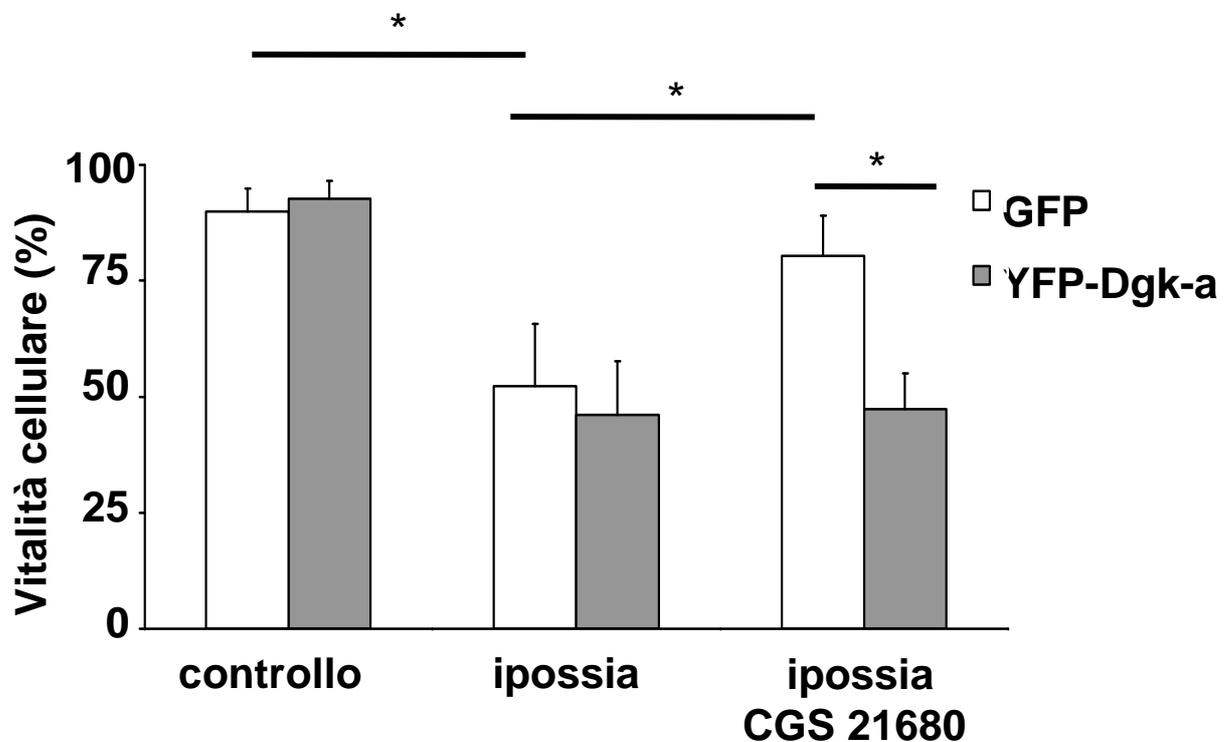
Epatociti primari di ratto sono stati pretrattati con C3 (120 Minuti 1 $\mu$ M), trattati per 30 minuti con CGS 21680 1  $\mu$ M e lisati. Dgk-θ è stata immunoprecipitata con l'anticorpo S.Cruz N-16 e la sua attività misurata in vitro con substati esogeni, viene mostrato un esperimento rappresentativo e la quantificazione di tre esperimenti indipendenti normalizzati per il controllo (\* = test t p<0,05).



**Fig. 15** R59949 10  $\mu\text{M}$  promuove l'accumulo di DAG e protegge gli epatociti dalla morte cellulare indotta da ipossia.

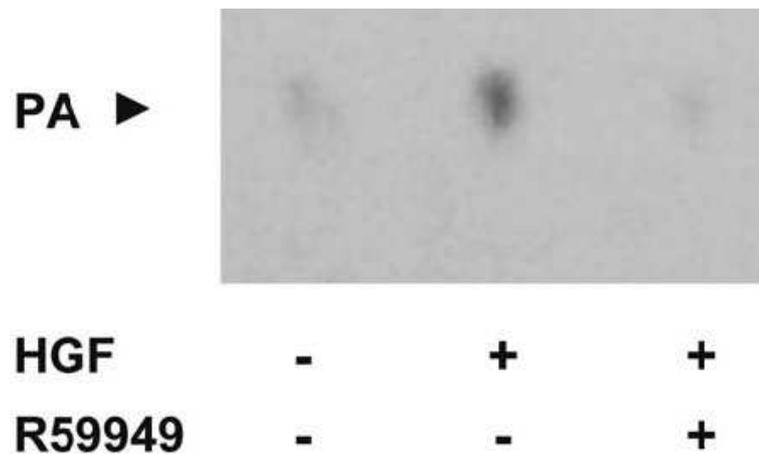
**A** Quantificazione del contenuto cellulare di DAG in epatociti controllo o trattati per 15 minuti con R59949 10  $\mu\text{M}$  o CGS 21680 1  $\mu\text{M}$ . I dati sono la media  $\pm$  errore standard di quintuplicati (\* test t  $p < 0,05$ ).

**B** Vitalità cellulare di epatociti controllo o mantenuti in ipossia per i tempi indicati in presenza od assenza di CGS 21680 1  $\mu\text{M}$  o R59949 10  $\mu\text{M}$ .



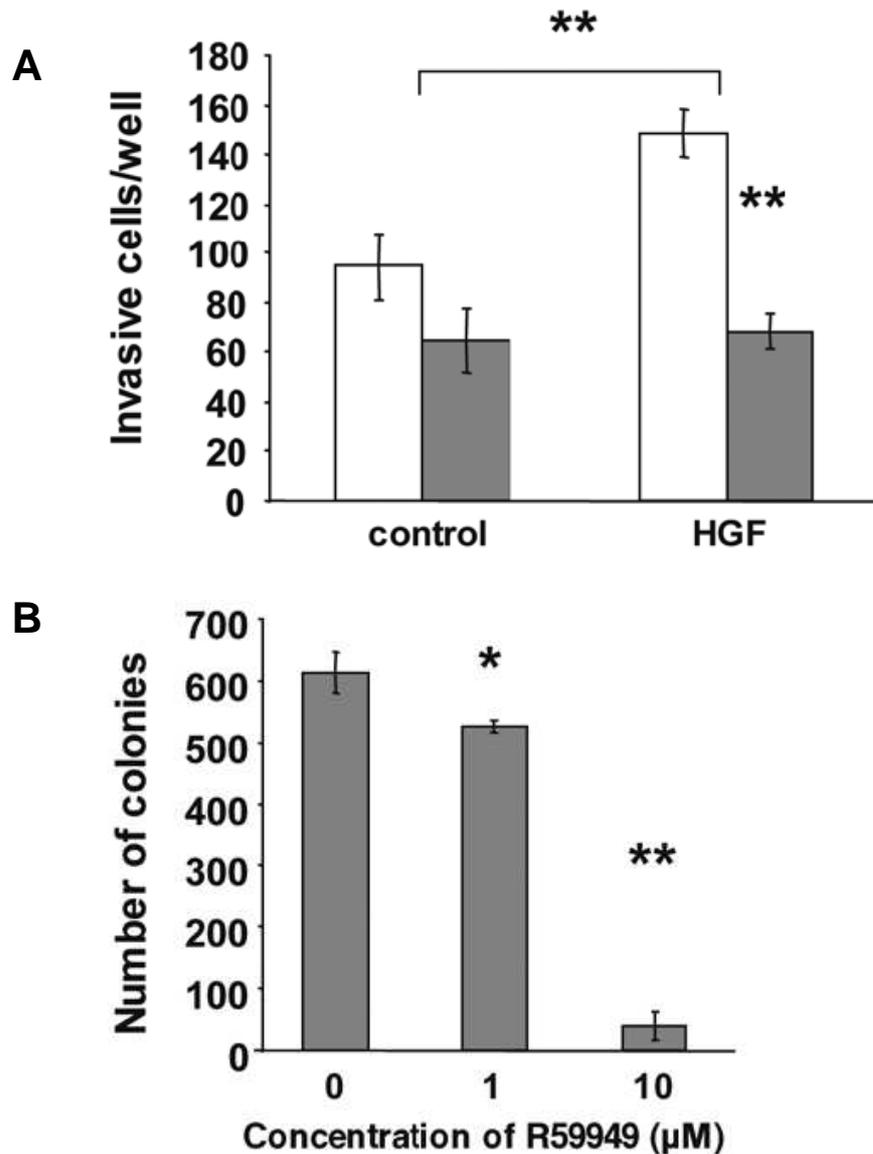
**Fig. 16 La sovraespressione di YFP-Dgk- $\alpha$  inibisce l'effetto protettivo di CGS 21680 in cellule HTC.**

Cellule HTC sono state trasfettate con GFP o YFP-Dgk- $\alpha$ . Dopo 48 ore le cellule sono state sottoposte ad ipossia per 2 ore in assenza od in presenza di CGS 21680 1  $\mu$ M. La vitalità delle cellule GFP positive è stata valutata al FACS dopo colorazione delle cellule necrotiche con propidio ioduro. I dati sono la media  $\pm$  errore standard di tre esperimenti indipendenti (\* t test  $p < 0,05$ ).



**Fig. 17 In cellule MDA-MB-231 HGF stimola una attività DGK R59949 sensibile**

Cellule MDA-MB-231 sono state trattate per 15 minuti con 100 ng/ml HGF. Successivamente le cellule sono state omogenate e l'attività DGK totale misurata in presenza od assenza di R59949 1  $\mu$ M.



**Fig. 18 R59949 inibisce l'invasione della matrice e la crescita in soft agar di cellule MDA-MB-231**

**A)** Saggio di invasione del matrigel in cellule MDA-MB-231 stimulate con 50 ng/ml HGF in presenza od assenza di 1 μM R59949.

**B)** Crescita in soft agar di cellule MDA-MB-231 in 1% FCS in presenza delle dosi indicate di R59949.

T test nei confronti del controllo \*\*  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ .