

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



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

Relazione 3° anno

TITOLO:

**Studio sul ruolo di α DGK
nella progressione tumorale
in vitro ed *in vivo***

Candidato: Paolo E. Porporato

Tutor: Prof. Andrea Graziani

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

DIACILGLICEROLO CHINASI

Le diacilglicerolo chinasi (DGKs) sono una famiglia di proteine coinvolte nel ciclo dei fosfoinositidi (PI). Hanno la funzione di fosforilare il diacilglicerolo (DAG), proveniente dall'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂), in acido fosfatidico (PA). Queste proteine hanno un importante ruolo in numerose vie di trasduzione del segnale: sviluppo, risposte neuronali e immuni, riorganizzazione del citoscheletro e carcinogenesi (Sakane *et al*, 2007).

Il diacilglicerolo e l'acido fosfatidico sono due importanti secondi messaggeri: il primo è un attivatore di proteine contenenti domini C1, come PKCs, RasGRPs e chimerine; il secondo regola diverse serine chinasi come mTor, Raf, proteine con attività GTPasica (come le Ras- e Rho- GAPs), PI4P-5-chinasi e PLC- γ (fig. 1). Quindi le DGKs agiscono come terminatori di segnali mediati dal diacilglicerolo e come attivatori di segnali indotti da acido fosfatidico (Van Blitterswijk, 2000).

Esistono 10 isoforme di DGK: tutte contengono un dominio lipide chinamico conservato e presentano almeno due motivi ricchi in cisteine (motivo a zinc finger che ricorda i domini C1 trovati in PKC). Le diverse proteine differiscono per altri domini che permettono la loro suddivisione in cinque categorie (fig. 2).

La DGK α , l'isoforma di nostro interesse, appartiene alla classe I (oltre alle isoforme β e alla γ), caratterizzata da siti di legame del calcio (EF-hands) e da un dominio omologo alla recoverina all'estremità N-terminale (Sakane *et al*, 2007). Si trova maggiormente espressa in linfociti T, ma, in minor misura, anche nelle cellule endoteliali, epiteliali ed oligodendrocitarie (Schapp *et al*, 1990).

Studi al microscopio confocale rivelano che la DGK α (DGKA) ha localizzazione citoplasmatica e nucleare e per essere attivata deve migrare sulla membrana del compartimento in cui è stato generato il DAG. In particolare, la stimolazione dei linfociti T con interleuchina 2 (IL-2) induce, dopo l'attivazione, la traslocazione dell'enzima nella regione perinucleare (Flores *et al*, 1996).

L'attivazione di DGK α stimolata da IL-2 promuove la transizione dalla fase G1 del ciclo cellulare alla fase S, stimola c-myc, c-fos, c-raf (protooncogeni), ma non bcl-2 e bcl-x_L (geni apoptotici), induce la fosforilazione di retinoblastoma (Rb) e l'attivazione della ciclina D3 (Flores *et al*, 1999). Quindi, la concentrazione intracellulare di PA potrebbe costituire uno dei più importanti fattori che la cellula controlla prima di entrare in mitosi.

L'attivazione di DGK α promossa da HGF (Hepatocyte growth factor) in cellule epiteliali induce l'invasione e lo scatter (Cutrupi *et al*, 2000). In cellule endoteliali VEGF (Vascular endothelial growth factor) attiva DGK α , stimolando così l'angiogenesi (Baldanzi *et al*, 2004)

L'inibizione di DGK α , ottenuta sia farmacologicamente con R59949 sia mediante l'espressione di un mutante cataliticamente inattivo che funziona da dominante negativo (DGK α -DN), blocca la migrazione in cellule endoteliali, la proliferazione cellulare, lo scatter e la tubulogenesi in cellule epiteliali in seguito a trattamento con HGF. Tutto questo può far supporre che DGK α abbia un ruolo nella tumorigenesi.

DGK α non ha nessun dominio SH2 o PTP e quindi non è associata direttamente a recettori tirosina chinasi, ma, in seguito a stimolazione delle cellule con HGF e con VEGF, DGK α interagisce con Src, una tirosina chinasi. Questi fattori di crescita, quindi, stimolano DGK α attraverso un meccanismo che richiede la formazione di un complesso con Src e la fosforilazione in tirosina di DGK α mediata da Src stesso. (Cutrupi *et al*, 2000)

La proteina di fusione NPM/ALK, in cui il recettore tirosina chinasi ALK è costitutivamente attivo, regola positivamente l'attività di DGK α mediante un meccanismo dipendente da Src. Questa tirosina chinasi si associa al dominio citoplasmatico del recettore, in particolare alla tirosina 418, attivandosi. Anche se Src non è attivata può legarsi ugualmente a DGK α . Inibendo l'attività catalitica di DGK α con R59949 o diminuendo la sua espressione con RNA interference specifico, si nota un calo della proliferazione delle cellule che esprimono NPM/ALK. Quindi si può dedurre che l'attivazione di DGK α è coinvolta nei segnali mitogenici e/o di sopravvivenza mediati da ALK (Bacchiocchi *et al*, 2005).

In vitro, HGF e v-Src (la forma costitutivamente attivata di Src) inducono lo scatter di molte cellule epiteliali attraverso la perdita delle adesioni cellulari mediate da caderine e l'aumento di mobilità dovuto alla formazione di lamellipodi e al rimodellamento delle

adesioni focali, in un processo dove è richiesta l'attivazione di DGKA (Chianale et al., 2007)

SCOPO DEL LAVORO

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

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

Successivamente il mio lavoro sarà volto a caratterizzare il ruolo della DGKA nella progressione tumorale "in vivo", per fare questo sarà necessario inoculare in topi immunodepressi una o più linee cellulari esprimenti o meno DGKA, o determinate forme mutate, per poter poi andare a caratterizzare a livello istologico il potenziale tumorale delle varie cellule.

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

Una volta ottimizzato questo strumento cellule esprimenti o meno ShRNA con DGKA saranno utilizzate per caratterizzare ulteriormente le vie di segnalazione in cui sia coinvolta DGKA come, ad esempio, la stimolazione indotta da GPCR come CXCR4, soprattutto alla luce delle recenti acquisizioni che indicano le DGKs come interattori di β -arrestina. (Nelson CD, Science 2007)

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Le cellule utilizzate sono le MDA-mb-231 (originate da carcinoma mammario). Le cellule sono state coltivate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ in terreno DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) arricchito con siero fetale bovino (FBS) al 10%, glutammina 1%, penicillina 100U/ml, streptomicina 100U/ml e micostatina 100U/ml.

LISI DELLE CELLULE

Le cellule MDA-mb-231 CTR e Sh sono state lavate con PBS 1X freddo e lisate con NP40 freddo.

Il lisato è stato trasferito in provette tipo eppendorf messe poi in agitazione su ruota per 20 minuti a 4°C per completare la lisi. Per far precipitare i detriti si è fatta una centrifuga di 20 minuti a 4°C alla massima velocità ed il surnatante è stato recuperato in nuove provette.

Le proteine ottenute sono state conservate a -80°C.

SEPARAZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE ELETTROFORESI IN SDS-PAGE E WESTERN BLOT

I lisati sono stati solubilizzati in tampone Laemmli (rapporto 5:1) contenente SDS (sodio dodecilsolfato), agente che induce la denaturazione delle proteine conferendo loro una carica negativa, e β -mercapto-etanolo, agente riducente che rompe i legami disolfuro provocando così la denaturazione della struttura terziaria delle proteine. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti a 100°C e sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilammide all'8%.

Dopo la corsa le proteine sono state trasferite su filtri di polivinilidene difluoruro (PVDF, HybondP Amersham) impiegando un sistema di elettrotrasferimento ad alta densità (The W.E.P. Company). Le membrane sono state saturate per immersione in metanolo e, prima di incubarle per tutta la notte con l'anticorpo primario, sono state essiccate. Dopo 4 lavaggi di circa 15 minuti l'uno in TBS-Tween 0,1%, alle membrane è stato aggiunto per 45 minuti l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di

rafano HRP (Horse Radish Peroxidase). Sono seguiti altri 4 lavaggi di 15 minuti l'uno sempre in TBS-Tween 0,1%.

Per rilevare il complesso anticorpo primario/anticorpo secondario-perossidasi è stato usato il kit Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences), composto da due reagenti da miscelare in rapporto 1:1. In presenza di perossido di idrogeno la perossidasi di rafano (HRP) catalizza l'ossidazione del luminolo in un endoperossido che si decompone dando origine a 3-amminoftalano, un dianione elettronicamente eccitato che quando ritorna nello stato fondamentale emette luce.

Per l'acquisizione dell'emissione chemiluminescence localizzata, che permette di visualizzare la banda con le proteine di interesse, è stato utilizzato l'apparato ottico elettronico VersaDOC (Bio-Rad) che è in grado di digitalizzare l'immagine. Il software di acquisizione e di analisi delle immagini è Quanta One (Bio-Rad).

SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

Il kit utilizzato per verificare il tasso proliferativo cellulare è Biotrak cell proliferation ELISA system (prodotto da Amersham Biosciences). Il metodo si basa sulla misurazione della 5-bromo-2'-deossipuridina (BrdU) che si inserisce al posto della timidina nella nuova catena di DNA nelle cellule in proliferazione.

Le cellule MDA-mb-231 CTR, Sh sono state piastrate in una piastra da 96 pozzetti in modo da avere 5000 cellule per pozzetto in 100µl di DMEM 10% FBS. Le cellule sono state coltivate per 16 ore in 0% FBS per poterle sincronizzare in una stessa fase del ciclo cellulare, in seguito sono stati aggiunti i trattamenti. A 48 ore dai trattamenti è stata aggiunta la BrdU ad una concentrazione di 10µM e le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C con 5% di CO₂ per 4 ore.

Allo scadere del tempo, il terreno è stato eliminato e sono stati aggiunti 200µl/pozzetto di fissativo per fissare le cellule e per far denaturare il DNA in modo tale che l'anticorpo potesse legare la BrdU incorporata. È stato incubato per 30 minuti a temperatura ambiente al buio.

Dopo aver eliminato il fissativo sono stati aggiunti 200µl/pozzetto di Blocking Reagent (diluito 1:10 in acqua bidistillata) per saturare i siti di legame aspecifici. È stato incubato per 30 minuti a temperatura ambiente al buio.

Dopo aver rimosso il Blocking Reagent sono stati aggiunti 100µl/pozzetto di anticorpo anti-BrdU legato alla perossidasi (diluito 1:100 nella soluzione di diluizione fornita dal kit). È stato incubato per 90 minuti a temperatura ambiente al buio.

Dopo aver eliminato l'anticorpo, le cellule sono state lavate per tre volte con 200µl/pozzetto di soluzione di lavaggio (diluente 1:10 in acqua bidistillata).

Sono stati distribuiti 100µl/pozzetto di TMB, il substrato per la perossidasi, ed è stato incubato per circa 5 minuti al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata con 25µl di acido solforico 1M per pozzetto.

La lettura della densità ottica è stata fatta ad una lunghezza d'onda di 450nm. I valori dell'assorbanza sono direttamente correlati con l'aumento della sintesi del DNA e quindi con il numero di cellule che si trovano nella fase S del ciclo cellulare.

RICOMBINAZIONE GATEWAY

Per trasferire il gene della DGK murina dal pDONOR221 al vettore lentivirale plenti 4/v5 è stata fatta una LR ricombinazione che si basa sulla ricombinazione sito specifica del fago lambda.

In una provetta eppendorf da 1,5ml sono stati aggiunti 3µl di plenti 4/v5, 1µl di pDONOR221 con DGK α murina, 4µl di TE buffer e 2µl di LR ricombinasi. Come controllo positivo al posto del pDONOR221 è stato aggiunto 1µl di pENTR-gus (plasmide fornito dal kit e, se la ricombinazione avviene, permette di generare un clone di espressione contenente il gene della β -glucuronidasi) e come controllo negativo non è stato aggiunto l'enzima. I campioni sono stati lasciati a 25°C per tutta la notte.

Il giorno successivo sono stati aggiunti 2µl di proteinasi K per la degradazione dell'enzima di reazione. È stata lasciata agire per 1 ora a 37°C.

I prodotti di reazione sono stati conservati a -20°C.

BATTERI COMPETENTI

Per produrre i batteri competenti è stata presa una piccola quantità di batteri *E.Coli* TOP10 dal -80°C ed è stata fatta crescere in agitazione per tutta la notte a 37°C in 5ml di LB senza ampicillina.

Il giorno successivo 1ml della coltura cresciuta per tutta la notte è stata fatta crescere in 100ml di LB senza ampicillina in agitazione a 37°C in modo che andasse in crescita esponenziale.

Ogni mezz'ora è stata misurata la densità ottica allo spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 590nm e la crescita è stata bloccata ad una O.D. 0,3. I batteri cresciuti sono stati distribuiti in 2 provette tipo falcon da 50ml fredde e centrifugati a 4000g a 4°C per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato risospeso in 5ml di CaCl₂ 100mM freddo utilizzando pipette raffreddate a -20°C. E' stato lasciato 5 minuti in ghiaccio.

I batteri sono stati centrifugati a 4000g a 4°C per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 2ml di CaCl₂ 100mM 15% glicerolo freddo.

Si è lasciato per tutta la notte in ghiaccio in frigo.

Il giorno successivo i batteri sono stati aliquotati in provette eppendorf e conservati a -80°C.

Tutte le operazioni sono state eseguite in ghiaccio.

TRASFORMAZIONE

Per verificare la ricombinazione Gateway sono stati trasformati batteri competenti.

I batteri competenti sono stati scongelati in ghiaccio e 100µl sono stati trasferiti in una provetta eppendorf da 1,5ml per ogni piastra da trasformare. Sono stati aggiunti 3µl di DNA in ogni provetta e si è lasciato 30 minuti in ghiaccio. Shock termico a 42°C per 40 secondi e 2 minuti in ghiaccio.

Si è aggiunto 1ml di LB preriscaldato a 37°C in ciascuna provetta e si è lasciato per 1 ora a 37°C. 100µl di sospensione batterica sono stati piastrati su piastre di LB agar con ampicillina (100ng/µl) e lasciati crescere per tutta la notte a 37°C. Anche per il controllo positivo della ricombinazione è stato usato LB agar con ampicillina (100ng/µl).

DGKA ASSAY

L'attività di DGKA è stata saggiata in immunoprecipitati anti-Myc come descritto in Cutrupi et al. 2000. In breve, immunoprecipitati per ciascun campione, sono stati incubati per 10' a temperatura ambiente con 1mg/ml di dioleina, 0.6mM ATP, 10µCi-³²P]-ATP (Amersham), 10mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 4mM EGTA in 35mM HEPES pH8.

L'estrazione dei lipidi è stata eseguita come descritto precedentemente (Graziani et al 1991). I lipidi sono stati separati mediante TLC in cloroformio:metanolo:acqua:32%-idrossido d'ammonio (60:47:10:3) ed i segnali radioattivi sono stati rilevati mediante l'apparato GS-250 Molecular Imager (BIO-RAD) e relativo Phosphor Analyst Software (BIO-RAD); il ^{32}P -PA è stato identificato per comigrazione con uno standard non radioattivo evidenziato mediante incubazione in camera da iodinazione.

RISULTATI

L'ABBATTIMENTO DELL'ESPRESSIONE DI DGKA TRAMITE ShRNA RIDUCE IL TASSO PROLIFERATIVO NELLE LINEE INFETTATE

Complesivamente con la sequenze interferente per DGKA sono state infettate 3 diverse linee cellulari tumorali:

- GTL16 linea di carcinoma gastrico
- MDA-MB-231 carcinoma mammario fortemente invasivo
- MOLT-4 linea di leucemia linfoblastica acuta

Il silenziamento di DGKA è risultato effettivo in tutte le linee infettate.

In tutte quante queste linee in cui è stata inibita l'espressione di DGKA si rileva un forte calo del tasso proliferativo pari a circa i due terzi rispetto alle linee parentali.

CELLULE GTL-16 E MDA-MB-231 PRIVE DI DGKA NON PERDONO LA CAPACITA' DI FORMARE TUMORI IN TOPI NUDI

Alla luce della riduzione del tasso proliferativo *in vitro* delle cellule infettate con l'interference per DGKA è stata saggiata la capacità delle cellule Sh (esprimenti ShRNA contro DGKA) e CTR (infettate con un lentivirus non esprimente l'interference) di formare tumori in un modello murino immunodepresso. A questo fine cellule GTL-16 CTR ed Sh sono state inoculate in topi nudi FoxN^{-/-} ed i tumori risultanti sono stati monitorati con un calibro ogni 2 giorni, i topi sono stati sacrificati al raggiungimento del tumore di un diametro di circa 1,5cm . Non sono emerse differenze di crescita tra le due linee cellulari.

Dati preliminari con cellule MDA-MB-231 indicano che anche in queste cellule l'inibizione costitutiva di DGKA non porta ad un ridotto tasso di attecchimento dei tumori, ma tumori inoculati direttamente nella cavità peritoneale sembrano portare a morte i topi inoculati con cellule CTR in maniera più rapida rispetto ai topi Sh.

PRODUZIONE DI UN VETTORE LENTIVIRALE DI “RESCUE” PER VERIFICARE LA SPECIFICITA’ DELLA SEQUENZA INTERFERENTE

Partendo dal plasmide pDonor221 contenente DGKA murina precedentemente clonata, è stata fatta una ricombinazione Gateway per inserire il gene di interesse nel pLenti4/v5. La reazione di ricombinazione effettuata è stata fatta utilizzando l'enzima LR clonasi.

Il plenti4/v5 contenente DGK α murina è stato utilizzato per la generazione del virus. Il lentivirus è stato sempre prodotto mediante la cotrasfezione di tre plasmidi necessari all'impaccamento e del plasmide di interesse nelle cellule 293 FT. Il lentivirus così ottenuto è stato utilizzato per infettare le cellule MDA-mb-231 Sh. Successivamente le cellule sono state sottoposte a selezione con Zeocina e le cellule sopravvissute dopo selezione hanno formato la linea cellulare MDA-MB-231 ShR esprimente una DGKA murina resistente all'interferenza da RNA.

Per valutare l'espressione di DGKA nelle cellule MDA-mb-231 CTR, Sh e ShR è stata eseguita una PCR.

Dopo aver piastrato le cellule e averle lasciate crescere fino al raggiungimento della confluenza, è stato estratto l'RNA con il kit Total RNA Isolation Nucleospin Total della Macherey-Nagel. L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA e sottoposto a PCR per verificare l'espressione della proteina di nostro interesse. Sono stati utilizzati primers specifici che amplificassero un frammento comune alla DGK α umana e murina. Per verificare la corretta amplificazione, i campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Le cellule MDA-mb-231 CTR e ShR esprimono il gene di DGKA rispettivamente umana e murina, mentre le Sh hanno questo gene silenziato

CELLULE INFETTATE CON VETTORE DI “RESCUE” PRESENTANO UNA COMPLETA REVERSIONE DEL FENOTIPO

Per verificare che le cellule MDA-mb-231 ShR avessero un tasso proliferativo simile a quello delle CTR, le cellule CTR, Sh e ShR sono state piastrate in modo tale da averne $5 \cdot 10^5$ per piastra. Dopo 48 e 72 ore sono state contate e, al termine dell'esperimento, sia le CTR sia le ShR mostravano un tasso di crescita superiore del 70% rispetto alle Sh.

Gli stessi esperimenti sono stati effettuati mediante l'analisi dell'incorporazione di BrdU con risultati analoghi.

Parallelamente sono stati fatti studi sulle capacità chemotattiche delle cellule MDA-MB-231 esprimenti l'RNA interference di DGKA ed anche in questo caso, in seguito alla ri-espressione di DGKA, si assiste alla completa reversione del fenotipo con un recupero pressochè totale dell'invasione indotta da HGF.

DGKA REGOLA LA RISPOSTA PROLIFERATIVA AD EGF

Il saggio di incorporazione di 5-bromo2'-deossipuridina (BrdU) è stato utilizzato anche per valutare la proliferazione delle cellule MDA-mb-231 in seguito a stimolazione con EGF.

Sono state piastrate 5000 cellule CTR e Sh per pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Dopo averle lasciate 16 ore in terreno DMEM privo di siero, sono stati aggiunti i trattamenti: 0% siero ed EGF 100ng/ml. La BrdU è stata aggiunta dopo 48 ore e lasciata agire per 4 ore. Le cellule sono state fissate ed è stato aggiunto l'anticorpo anti-BrdU.

Le cellule MDA-mb-231 Sh, al contrario delle CTR, non subiscono un aumento significativo di proliferazione in risposta al fattore di crescita.

MDA-MB-231 IN SEGUITO AD ABBATTIMENTO CON DGKA NON PRESENTANO UNA RIDUZIONE DELLA VITALITA'

Per verificare, parallelamente alla riduzione del tasso proliferativo, che si accompagnasse anche una riduzione della vitalità delle cellule MDA-mb-231 CTR e

Sh, è stato fatto un saggio MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide].

Le cellule sono state piastrate in modo tale da averne 10^4 per ciascun pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Dopo quattro ore, tempo necessario alle cellule per aderire, le cellule sono state trattate con DMEM 0% e 10% siero e con PBS per due ore. Successivamente è stato aggiunto l'MTT e si è incubato per altre due ore a 37°C. Questo esperimento è stato svolto nell'arco della giornata al fine di minimizzare le differenze correlate al diverso tasso proliferativo.

Le cellule MDA-mb-231 Sh non sono in una quantità significativamente minore rispetto alle cellule controllo: ciò significa che la loro ridotta proliferazione non è dovuta ad una sofferenza cellulare.

DGKA VIENE ATTIVATA IN SEGUITO A STIMOLAZIONE DI CXCL12

Al fine di valutare la regolazione dell'attività diacilglicerol-cinasi di DGKA da CXCL12/SDF-1 tramite stimolazione del GPCR CXCR4, cellule HELA sono state trasfettate con Myc-DGKA ed, in seguito a starvatura, sono state stimulate le cellule con SDF-1 100vg/ml per 1',5',15' minuti, come controllo positivo è stato utilizzato HGF 100vg/ml.

Parte dei lisati proteici sono stati utilizzati per un western blotting volto alla normalizzazione del segnale.

Da questa analisi emerge un'attivazione di DGKA già ad un minuto, 3 volte più intensa di quella indotta da HGF, andando a diminuire a 15 Minuti.

DGKA E' RICHIESTA PER MEDIARE IL SEGNALE INVASIVO INDOTTO DA SDF-1a

Il potenziale invasivo indotto da SDF-1 è stato saggiato in cellule MDA-mb-231 esprimenti o meno ShRNA per DGKA. In breve, cellule MDA-MB231 SH1 (infettate recanti shRNA), MDA-MB-231 CTR e cellule MDA-mb-231 ShR sono state piastrate in pozzetti transwell porosi (8uM, BD) e trattate con e senza SDF-1 100 ng/ml.

In seguito a trattamento con SDF-1 le cellule MDA-mb-231 CTR rispondono con un raddoppio dell'attività invasiva, a differenza delle cellule in cui l'espressione di DGKA è stata abbattuta dove non è presente nessuna stimolazione dell'invasione, a riprova

della specificità del sistema, cellule in cui è stata nuovamente espressa una DGKA resistente all'RNA interference presentano un ripristino dell'attività invasiva.

DISCUSSIONE

Al fine di caratterizzare il ruolo di DGKA nei processi di progressione tumorale ho sviluppato un sistema di RNAi volto al silenziamento costitutivo dell'espressione di questa isoforma, una volta fatto ciò ho infettato diversi tipi di linee cellulari tumorali.

Tutti queste linee cellulari mostrano un forte abbattimento dell'espressione di DGKA parallelo ad un forte calo della proliferazione, che, almeno nella linea di carcinoma mammario MDA-mb-231, in seguito a studi di vitalità, non sembra correlare con un aumento dell'apoptosi.

Come controllo della specificità degli effetti riscontrati in presenza dell'RNA interference ho sviluppato un modello di "salvataggio" tramite l'espressione di una DGKA murina resistente all'RNA interference umana, questo approccio era già stato tentato precedentemente attraverso l'inserimento di un'isoforma mutata, ma questa non aveva dato risultati apprezzabili in quanto soggetta a grossi problemi di espressione.

L'ortologo murino di DGKA, invece, è stato fatto esprimere da cellule infettate con ShRNA tramite inserimento in un vettore lentivirale, una volta infettate le cellule queste hanno riacquisito un normale tasso di proliferazione dimostrando che il fenotipo riscontrato in seguito all'inserimento dell'interference era effettivamente legato all'abbattimento dell'espressione della DGKA e non ad effetti di *off-target*.

Alla luce dei dati ottenuti con l'inibitore farmacologico R59949, per quanto concerne l'inibizione della crescita in assenza di ancoraggio, e di questi dati di riduzione della proliferazione ho deciso di inoculare cellule GTL-16 ed MDA-mb-231 in topi nudi per valutare la loro capacità di formare tumori. Tutti quanti i topi inoculati con GTL-16, esprimenti o meno DGKA, hanno sviluppato tumori con un tasso di crescita confrontabile indipendentemente dalla linea cellulare inoculata.

Anche cellule MDA-mb-231 inoculati in topi nudi formano tumori indipendentemente dalla presenza/assenza di DGKA, questi esperimenti, però sono ancora preliminari e le forti capacità invasive di queste cellule rendono difficile la misurazione del tasso di crescita in quanto gli animali muoiono rapidamente per colonizzazione metastatica, un dato interessante, ma ancora notevolmente preliminare, è che topi inoculati con cellule di controllo muoiono più rapidamente dei topi non esprimenti DGKA (circa 10% in meno di giorni post-inoculo). Ulteriori studi saranno richiesti per capire se in questo

modello il calo del tasso di mortalità sia legato ad un ridotto potenziale invasivo o ad un ridotto tasso proliferativo.

Parallelamente alla caratterizzazione del ruolo di DGKA nella progressione tumorale *in vivo* abbiamo orientato i nostri studi al chiarimento del ruolo di DGKA nella via di segnalazione di SDF-1 una chemochina che oltre a rivestire un forte ruolo nell'emopoiesi è estremamente importante nella mobilitazione delle metastasi (Muller A, Nature 2001), soprattutto alla luce di alcuni recenti dati comparsi in letteratura che indicano come le DGKA siano potenziali interattori di β -arrestina. (Nelson CD, Science 2007)

Per prima cosa, quindi, ho deciso di valutare se era presente una qualche regolazione dell'attività cinasica di DGKA in seguito a stimolazione con SDF-1 attraverso un saggio cinasico, dal quale è emersa un'aumentata attività già ad un minuto dall'aggiunta della chemochina; sono quindi andato a valutare la regolazione del potenziale invasivo in seguito a stimolazione di SDF-1 ed anche in questo caso è emersa una dipendenza del potenziale invasivo da DGKA, infatti, se in presenza della chemochina si assiste ad un raddoppio dell'attività invasiva, questa è presente solamente nelle cellule che non esprimono l'RNA interference contro DGKA o dove la sua espressione è stata vicariata dall'ortologo murino utilizzato come controllo di specificità del fenotipo. Sarà ora necessario approfondire questi dati con ulteriori studi volti a caratterizzare ulteriormente il ruolo della DGKA nella via di segnalazione di questa chemochina fondamentale sia per l'emopoiesi che per la colonizzazione metastatica.

BIBLIOGRAFIA

Bacchiocchi, R., Baldanzi, G., Carbonari, D., Capomagi, C., Colombo, E., van Blitterswijk W.J., Graziani, A., Fazioli, F., (2006), 'Activation of α -diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase', *Neoplasia*, **106**, pp. 2175-2182.

Baldanzi, G., Mitola, S., Cutruoi, S., Filigheddu, N., van Blitterswijk, W.j., Sinigaglia, F., Bussolino, F., Graziani, A., (2004), 'Activation of diacylglycerol kinase α is required for VEGF-induced angiogenic signal *in vitro*', *Oncogene*, **23**, pp. 4828-4838.

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

Brummelkamp, T.R., Bernards R., Agami, R., (2002), 'Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference', *Cancer Cell*, **2**, pp. 243-247.

Cullen, B.R., (2005), 'Induction of stable RNA interference in mammalian cells', *Gene Therapy*, pp.1-6.

Cutrupi, S., Baldanzi, G., Gramaglia, D., Maffè, A., Schaap, D., Girando, E., van Blitterswijk, W.J., Bussolino, F., Comoglio, P.M., Graziani, A., (2000), 'Src-mediated activation of α -diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility', *The EMBO Journal*, **19**, pp.4614-4622.

Cutrupi, S., Chianale, F., Rainero, E., Baldanzi, G., Porporato, P.E., Traini, S., Filigheddu, N., Gnocchi, V.F., Santoro, M., Parolini, O., Sinigaglia, F., Graziani, A., (2007), 'Diacylglycerol kinase- α mediates HGF-induced epithelial cell scatter by regulating Rac activation and membrane ruffling', *MBC 2007 submitted*

Flores, I., Casaseca, T., Martinez-a, C., Kanoh, H., Mérida, I., (1996), 'Phosphatidic Acid Generation through Interleukin 2 (IL-2)-induced α -Diacylglycerol Kinase Activation

Is an Essential Step in IL-2-mediated Lymphocyte Proliferation', *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, pp. 10334-10340.

Flores, I., Jones, D., Ciprés, A., Díaz-Flores, E., Sanjuan, M.A., Mérida, I., (1999), 'Diacylglycerol Kinase Inhibition Prevents IL-2-Induced G₁ to S Transition Through a Phosphatidylinositol-3 Kinase-Independent Mechanism', *The Journal of Immunology*, **163**, pp. 708-714.

Goto, K., Kondo, H., (2004), 'Functional implications of the diacylglycerol kinase family', *Advances in Enzyme Regulation*, **44**, pp. 187-199.

Graziani A, Gramaglia D, Cantley LC, Comoglio PM (1991) *JBC* **266**(33):22087-90.
Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Pennacchietti, S., Risio, M., Naldini, L., Comoglio, P. M., Michieli, P. (2004) , 'An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice', *The journal of clinical investigation*, **114**, pp.1418-1432.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):50-6.

Nelson CD, Perry SJ, Regier DS, Prescott SM, Topham MK, Lefkowitz RJ. Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science*. 2007 Feb 2;315(5812):663-6.

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

Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., Kanoh, H., (2007), 'Diacylglycerol kinases: why so many of them?', *Biochimica et Biophysica Acta*, , pp.1-14.

Schapp, D., de Widt, J., van der Wal, J., Vandekerekhove, J., van Damme, J., Gussow, D., Ploegh, H.L., van Blitterswijk W.J., van der Bend, R.L., (1990) 'Purification, cDNA-cloning and expression of human Diacylglycerol kinase', *FEBS*, **275**, 151-158.

Topham, M.K., (2006), 'Signaling Roles of Diacylglycerol Kinases', *Journal of Cellular Biochemistry*, **97**, pp. 474-484

Van Blitterswijk, W. J., Houssa, B., (2000), 'Properties and functions of diacylglycerol kinases', *Cellular Signaling*, **12**, pp. 595-605.

ATTIVITA'FORMATIVA

In questi anni di dottorato ho collaborato con il Prof. Graziani allo svolgimento delle esercitazioni di biochimica per gli studenti del primo anno di biotecnologie nell'ambito del corso di biochimica. Ho inoltre condotto le esercitazioni di bioinformatica sempre presso il suddetto corso di biochimica. Infine, in questo anno, oltre all'attività di ricerca ho seguito la formazione di 2 studenti triennali e 2 studenti specialisti presenti nel nostro laboratorio.

Gene Silencing By Rna Interference (Rnai)

10 Gennaio 2007

Prof. Ssa P. Defilippi

The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis

11 settembre 2006

Dr Prof. Dieter Brömme, Ph.D.

Detection Of Mirna Target Genes Through Statistical
Analysis Of Dna Motifs In Human-Mouse 3'-Utr Regions

17 Gennaio 2007

Prof. M. Caselle

Nuovi Ruoli Per Le Proteine Adattatrici P130cas E P140cap Nella Trasformazione Tumorale E Nel
Carcinoma Alla Mammella

25 Gennaio 2007

Prof. sa P. DeFilippi

Vita, Opere E Miracoli Dell'epatocita

9 Febbraio 2007

Prof. M Tripodi

Protein Microarrays Development Of New Supports For Improved Sensitivity

14 Marzo 2007

Dr. M. Cretich

Colangiopatie Autoimmuni

15 Marzo 2007

Prof. M. Podda

Microarrays Di Tessuti: Una Strategia Per Identificare Nuovi Biomarcatori Tumorali

16 Marzo 2007

Dott. Ssa M. Capra

Marcatori Farmacogenetici Nel Carcinoma Coloretale: Quali Prospettive Per Una Terapia
Personalizzata?

29 Marzo 2007

Prof. E. Mini

Relazione Tra Struttura E funzione Delle Proteine Mediante Analisi Del Preotein Data Base

12 Aprile 2007

Prof. Milanesio

Difetti Genetici Del Pre-B Cell Receptor

16 Maggio 2007

Prof. Ferrari

The Regulation Of Hematopoietic Stem Cells By Smad Signaling

25 Maggio 2007

Dott. S. Karlsson

Translating Basic Science Into Therapeutic Strategies For Shwachmann Diamond Syndrome

28 Maggio 2007

Dott. R. Ellis

Sindromi Autinfiammatorie

4 Giugno 2007

Prof. A Martini

Bioinformatics Tools For The Analyses Of Utrs And For The Prediction Of Alternative Splice Site

21 Giugno 2007

Prof. E Mignone

SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

Corsi seguiti nel secondo anno di dottorato

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

Corsi seguiti nel primo anno di dottorato

Statistica (Prof. Magnani)

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

Molecular Targets for Cancer (X3) Meeting Detail March 18 - 23, 2007 • Whistler Resort, Whistler

FISV 2005, Riva del Garda 28-1 ottobre 2006

CNB8: 8th national biotechnology congress, Siena 7-9 settembre 2005.

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

Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.

1° Convegno Biotecnologi, Sezione Piemonte. Torino, Italia, 27-28 Febbraio 2004.

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

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Molecular Targets for Cancer (X3) Meeting Detail March 18 - 23, 2007 • Whistler Resort, Whistler

Development of a new tool to study the role of Diacylglycerol kinase Alpha in tumour progression.

P.E. Porporato, Federica Chianale, Gabriella Ranaldo, Chiara Ambrogio, Nicoletta Filigheddu, Viola Gnocchi, Gianluca Baldanzi, Sara Traini, Andrea Graziani

FISV 2005, Riva del Garda 28-1 ottobre 2006

“Development of a new tool to study the role of DGK alpha in tumour progression”

P.E. Porporato, Chianale F, Ambrogio C, Taulli R, Ranaldo G, Gnocchi V, Traini S, Graziani A

CNB8: 8th national biotechnology congress, Siena 7-9 settembre 2005.

P.E. Porporato, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Rainero, R. Taulli, G. Baldanzi, G. Brignoli, V. Gnocchi, M. Coscia, N. Filigheddu and A. Graziani. ShRNA for a constitutive knock down of diacylglycerol kinase alpha expression.

P.E. Porporato, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Rainero, R. Taulli, G. Baldanzi, G. Brignoli,

V. Gnocchi, M. Coscia, N. Filigheddu and A. Graziani. ShRNA for a constitutive knock-down of Diacylglycerol kinase alpha expression. Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.

P.E. Porporato, Gramaglia E, Bondi A, Carturan S, Gottardi E, Roetto A, Camaschella C. Espressione dei geni dell'emocromatosi in modelli animali di anemia e sovraccarico di ferro. 1° Convegno Biotecnologi, Sezione Piemonte. Torino, Italia, 27-28 Febbraio 2004. (oral communication)

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

"ShRNA to study the role of diacylglycerol kinase alpha in tumorigenesis".

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

B) Altre comunicazioni

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

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

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

FISV 2005, Riva del Garda 28-1 ottobre 2006

"Ghrelin induces differentiation and fusion of C2C12 myoblasts and protects myotubes from atrophy"

Gnocchi Viola, Filigheddu N, Traini S, **Porporato P**, Chianale F, Baldanzi G, Taulli R, Graziani A

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

"Dgk-alpha regulates Hgf-induced cell motility through Rac".

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

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

"Ghrelin induces differentiation and fusion of C2c12 myoblasts and protects myotubes from atrophy".

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

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

"Src-mediated phosphorylation of Dgk α -a on tyrosine 335 is required for its activation, membrane recruitment and Hgf-induced cell motility".

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

Proteine 2006 – Novara, 1-3 giugno 2006.

"Dgk-a regulates Hgf and v-Src-induced cell motility through paxillin and Rac".

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

Proteine 2006 -Novara 1-3 giugno 2006.

"Alfa-Diacylglycerol in tyrosine kinase signaling".

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

Proteine 2006 Novara 1-3 giugno 2006.

"Dgk-a regulates HGF and v-Src-induced cell motility through Paxillin and Rac".

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

Proteine 2006 Novara 1-3 giugno 2006.

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

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

Convegno Annuale SIB Sezione Ligure-Lombardo-Piemontese. Novara, 20 maggio 2005.

F. Chianale, S. Cutrupi, C. Deantonio, E. Reineri, **P. Porporato**, G. Baldanzi, G. Brignoli, **V. Gnocchi**, N. Filigheddu and A. Graziani. Diacylglycerol kinase- α regulates HGF-induced epithelial cell motility by acting on focal complexes assembly and RAC1 localization and activation.

CNB8: 8th national biotechnology congress, Siena 7-9 settembre 2005.

V. Gnocchi, N. Filigheddu, M. Coscia, F. Chianale, S. Cutrupi, G. Baldanzi, **P. Porporato**, G. Brignoli and A. Graziani. Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular system: an *in vitro* study and *in vivo* perspectives.

FISV 2005, Riva del Garda 22-25 settembre 2005

G. Brignoli, G. Baldanzi, F. Chianale, **P. Porporato**, V. Gnocchi, N. Filigheddu, S. Cutrupi and A. Graziani. Role of Diacylglycerol Kinase Alpha in EGF receptor regulation.

FISV 2005, Riva del Garda 22-25 settembre 2005

F. Chianale, S. Cutrupi, **P. Porporato**, G. Baldanzi, G. Brignoli, V. Gnocchi, N. Filigheddu and A. Graziani. Alpha Dgk regulates HGF-induced epithelial cell motility by acting on focal complexes and Rac1 localization and activation.

V. Gnocchi, N. Filigheddu, M. Coscia, F. Chianale, S. Cutrupi, G. Baldanzi, **P. Porporato**, G. Brignoli and A. Graziani. Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular systems: an *in vitro* study and *in vivo* perspectives. Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.

G. Brignoli, G. Baldanzi, F. Chianale, **P. Porporato**, V. Gnocchi, N. Filigheddu, S. Cutrupi and A. Graziani. **Role of Diacylglycerol Kinase α in EGF receptor regulation.** Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.

Graziani A, Filigheddu N, Brunelli S, Coscia M, **Porporato P**, Brignoli G, Gallo S, Cossu G, Gnocchi V.

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

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

Role of Diacylglycerol Kinase α in RGF receptor regulation.

ABCD 2005 - Certosa di Pontignano (Siena), Marzo , 2005

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

Diacylglycerol Kinase- α 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

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

Bondi A, Valentino P, Daraio F, **Porporato P**, Gramaglia E, Carturan S, Gottardi E, Camaschella C, Roetto A. *Hepatic expression of hemochromatosis genes in two mouse strains after phlebotomy and iron overload.* Haematologica. 2005 Sep;90(9):1161-7.

Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, **Porporato PE**, Taulli R, Traini S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S, Arnoletti E, Ghe C, Fubini A, Surico N, Sinigaglia F, Ponzetto C, Muccioli G, Crepaldi T, Graziani A. *Ghrelin and Des-Acyl Ghrelin Promote Differentiation and Fusion of C2c12 Skeletal Muscle Cells.* Mol Biol Cell. 2007 Jan 3

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 Res. 2007 May-Jun;27(3B):1489-92.

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- α phosphorylation by Src on Y335 is required for activation, membrane recruitment and Hgf-induced cell motility. Oncogene. 2007 Aug 13; [Epub ahead of print]