

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

**Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare**  
**XVIII ciclo**

Dipartimento di Scienze Mediche

Laboratorio di Biochimica del Prof. Graziani

***Alfa-diacilglicerolo cinasi è coinvolta nella transizione  
epitelio-mesenchima (EMT)***

***Focus sulla relazione  $\alpha$ Dgk-PIP<sub>2</sub>, sulle adesioni focali e  
sul movimento cellulare***

Relazione annuale relativa all'anno 2003-2004 di Federica Chianale

## **INTRODUZIONE**

La famiglia delle diacilglicerolo cinasi (Dgk) è suddivisa, sulla base di domini caratteristici, in 5 classi e l'isoforma alfa appartiene alla prima di esse. Comuni a tutte e 9 le isoforme di Dgk presenti nei mammiferi sono il dominio catalitico, altamente conservato, ed almeno due domini ricchi in cisteine, strutturati a zinc-finger, omologhi a quelli di PKC e Raf (1). Tutte le diacilglicerolo cinasi fosforilano il diacilglicerolo (DAG o DG) generando acido fosfatidico (PA) e sono enzimi citosolici o nucleari, che devono traslocare alla membrana plasmatica o altre membrane intracellulari per guadagnare l'accesso al loro substrato. La  $\alpha$ Dgk è inoltre caratterizzata nella porzione N-terminale da un dominio recoverin-homology e da due domini inibitori EF-hand che, legando calcio, permettono l'attivazione dell'enzima.

Il ruolo fisiologico delle Dgk è tuttora solo parzialmente delucidato; è descritto che  $\alpha$ Dgk viene attivata in cellule T stimolate con IL-2, mediandone il segnale proliferativo, o attraverso l'attivazione di recettori G-coupled (2,3). Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che  $\alpha$ Dgk viene attivata da HGF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) e da VEGF (Vascular-Endothelial Growth Factor), rispettivamente in cellule epiteliali ed endoteliali (4, 5, Cutrupi et al. manoscritto in preparazione). L'attivazione di  $\alpha$ Dgk da parte di HGF e VEGF è mediata da fosforilazione in tirosina, sia in vitro sia in cellule intatte, e necessita dell'attività della tirosina cinasi Src, con la quale  $\alpha$ Dgk forma un complesso (4, 5). Oggetto di studio rimangono i dettagli dell'interazione fra Src e  $\alpha$ Dgk ed il meccanismo molecolare mediante il quale Src attiva  $\alpha$ Dgk. In linfociti T,  $\alpha$ Dgk è regolata anche dal prodotto fosfatidilinositolo (3,4,5)-trifosfato (PIP3) della fosfatidilinositolo 3-cinasi (PI3K) (6), ma se tale regolazione sussista anche in cellule epiteliali rimane da determinare.

L'attivazione di  $\alpha$ Dgk è necessaria per la migrazione, lo scatter, la transizione epitelio-mesenchima (EMT) e l'invasione indotti da HGF in cellule epiteliali (4,5 e manoscritto in preparazione) e per la migrazione, la proliferazione, la tubulogenesi e l'angiogenesi indotti da VEGF in cellule endoteliali (5). Dati ancora da pubblicare dimostrano inoltre un ruolo importante di  $\alpha$ Dgk anche per la trasduzione del segnale integrinico e per lo spreading di cellule epiteliali su matrice extracellulare.

La transizione epitelio-mesenchima è un processo caratteristico dello sviluppo embrionale ed avviene in modo rigidamente controllato. Nella EMT cellule epiteliali appartenenti ad un tessuto si dissociano da esso assumendo caratteristiche fibroblastoidi mediante perdita della polarità basolaterale e delle giunzioni cellula-cellula, downregolazione dei geni che codificano per molecole dell'adesione e acquisizione di motilità (scatter); talvolta le cellule iniziano anche la produzione di matrice extracellulare o di proteasi della matrice, per facilitare l'invasione e la motilità. Questo tipo di processo è ugualmente caratteristico delle cellule di carcinomi epiteliali che assumono un fenotipo invasivo (6). HGF è il prototipo di fattore inducente scatter e anzi HGF possiede la capacità di indurre cambiamenti morfogenetici anche più complessi come la tubulogenesi in collagene tridimensionale. Dato il ruolo di  $\alpha$ Dgk nella trasduzione del segnale a valle di HGF, gli studi condotti dal nostro laboratorio sono volti a delucidare il ruolo di  $\alpha$ Dgk proprio nei singoli aspetti della EMT, ovvero nella motilità cellulare e nell'adesione. Durante il movimento, infatti, le cellule modificano il citoscheletro di actina e le adesioni focali e nel movimento cellulare stesso si individuano 4 fasi, contemporanee ma distinte dal punto di vista meccanico (8):

1. protrusione: dalla membrana plasmatica vengono estesi, nella direzione di avanzamento, lamellipodi e filopodi mediante polimerizzazione regolata di filamenti di actina.

2. formazione di nuovi siti di adesione che collegano il citoscheletro alla matrice extracellulare (complessi focali).

3. contrazione del corpo cellulare: il corpo cellulare viene spostato in avanti, in direzione della protrusione, facendo perno sui nuovi punti d'adesione precedentemente formati.

4. distacco: la parte posteriore della cellula si deve distaccare dalla matrice per permettere l'avanzamento.

Nel movimento cellulare un altro evento centrale è rappresentato dal turnover delle adesioni focali. L'adesione focale è caratterizzata dalla presenza di un recettore integrinico, legato alla matrice sul versante extracellulare e ad un complesso di proteine citoscheletriche sul versante citoplasmatico. Questo complesso è costituito da proteine con funzione strutturale quali vinculina,  $\alpha$ -actinina, tensina, talina e paxillina, e proteine con funzione regolatoria, come Src, FAK e Crk. Caratteristica delle adesioni focali è proprio la dinamicità, per cui vengono continuamente assemblate, modificate e disassemblate: è grazie a questo riciclo che la cellula può muoversi e rispondere a segnali extracellulari. La regolazione del turnover delle adesioni focali è un processo complesso nel quale vengono integrati segnali provenienti dall'adesione e dai fattori di crescita.

Un ruolo importante nella regolazione delle adesioni focali è rivestito da un'altra classe di cinasi lipidiche, le fosfatidilinositolo fosfato 5-cinasi (PIPK) di tipo 1, che fosforilano il PI(4)P a PI(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>). Il PIP<sub>2</sub> infatti è un regolatore fondamentale per il rimodellamento del citoscheletro di actina e delle adesioni focali (reviewed in 9).

E' stato dimostrato che l'isoforma  $\alpha$  della PIPK di tipo 1 (PIPK-I $\alpha$ ) è attivata dalla small-GTPasi Arf6 e si può notare, in cellule Hela, la colocalizzazione di PIPK-I $\alpha$ , del suo prodotto PIP<sub>2</sub> e della stessa Arf6 alla membrana dei lamellipodi indotti da EGF. In questo modello, la produzione locale di PIP<sub>2</sub> è necessaria, a valle di Rac, alla formazione dei lamellipodi (10). La formazione dei lamellipodi è un fenomeno tipicamente diendente da Rac (reviewed in 11) ed è dimostrato in una linea di osteosarcoma che la PIPK-I $\alpha$  ed il suo prodotto PIP<sub>2</sub> sono necessari alla formazione dei ruffles di membrana indotti da PDGF e Rac (12). Il coinvolgimento di PIPK-I $\alpha$  nella formazione dei lamellipodi è inoltre sottolineato dal fatto che le forme attive di Rac e Rho ne inducono la localizzazione in membrana e ne incrementano l'attività (19).

L'isoforma  $\gamma$  della PIPK di tipo 1 è centrale invece nella regolazione delle adesioni focali: PIPK-I $\gamma$  lega talina, proteina strutturale delle adesioni focali, e mediante questa interazione viene reclutata alle adesioni focali (13). La fosforilazione della tirosina 644 di PIPK-I $\gamma$  da parte di Src, processo regolato a monte da FAK, promuove il legame di talina a PIPK-I $\gamma$  e tale interazione incrementa l'attività di PIPK-I $\gamma$  alle adesioni focali. Poichè il legame di talina a PIPK-I $\gamma$  o alla catena  $\beta$  delle integrine è mutuamente esclusivo, la regolazione del complesso PIPK-I $\gamma$ /talina è uno strumento per la regolazione fine della produzione di PIP<sub>2</sub> alle adesioni focali e della composizione molecolare delle adesioni focali stesse (14,15).

Oltre al fatto che le PIPK-I  $\alpha/\gamma$  sono coinvolte in fenomeni strettamente correlati a quelli in cui è coinvolta  $\alpha$ Dgk, l'importanza per i nostri studi delle PIPK-I risiede nel fatto esse sono attivate *in vitro* ed *in vivo* da PA, prodotto di Dgk (oltre che PLD) (16). E' documentato che una PIPK di tipo 1 si ritrova in un complesso molecolare con Rac, RhoGDI ed una Dgk, sebbene dalla caratterizzazione effettuata essa pare non essere la  $\alpha$  (17). E' stato inoltre dimostrato che  $\zeta$ Dgk e PIPK-I $\alpha$  coprecipitano in lisati di cellule

epiteliali e colocalizzano alla membrana dei lamellipodi in cellule epiteliali in movimento (18).

Altri elementi chiave nella rete molecolare necessaria al movimento cellulare sono le piccole proteine G della famiglia di Rho: Rho, Rac e Cdc42, dotate di attività GTPasica (idrolizzano il GTP a GDP), attive quando legate al GTP e controllate da una complessa rete di fattori che promuovono il legame al GDP o al GTP (reviewed in 11). In breve: RhoA segnala per la formazione delle adesioni focali (stabili) associate con le fibre di stress, mentre Rac e Cdc42 segnalano per la formazione di complessi focali (dinamici) associati rispettivamente a lamellipodi e filipodi.

Il movimento cellulare necessariamente dipende dall'equilibrio e dalla competizione dei segnali provenienti dalle diverse small-G protein. In cellule epiteliali, HGF, o la sovraespressione dell'adattatore molecolare CrkL, induce la traslocazione della paxillina dal citoplasma ai complessi focali e promuove la formazione di un complesso sovramolecolare costituito da paxillina, Rac,  $\beta$ PIX (un suo attivatore) e GIT2 (GAP per la famiglia delle small-G protein Arf). La formazione di tale complesso è dipendente da Rac ma d'altra parte anche un mutante di paxillina non in grado di legare GIT2 blocca lo spreading e la formazione di lamellipodi (fenomeni dipendenti da Rac). Un modello proposto è che Rac promuova la formazione di complessi focali contenenti paxillina e che tali complessi siano necessari per l'ulteriore attivazione di Rac che porta allo spreading e al ruffling (20). Anche  $\alpha$ Dgk è coinvolta nell'assemblamento di complessi focali: la sua inibizione altera la fosforilazione in tirosina della paxillina e blocca la traslocazione di questa dal citosol ai complessi focali indotti da HGF in cellule epiteliali (manoscritto in preparazione). E' ipotizzabile dunque una correlazione fra  $\alpha$ Dgk e Rac/Rho, anche di fronte al dato dell'esistenza di un complesso sovramolecolare contenente Rac, una PIPK-I e una Dgk (17).

## **RISULTATI e COMMENTO**

### **Monitoraggio della distribuzione intracellulare del PIP<sub>2</sub>**

Ho scelto di monitorare la distribuzione intracellulare del PIP<sub>2</sub> in quanto questo lipide è il prodotto della reazione catalizzata dalle PIPK di tipo 1, enzimi regolati da PA, prodotto di Dgk, e già ritrovati in complessi molecolari con attività ed altre isoforme di Dgk. Inoltre, le PIPK- $\alpha$  e  $\gamma$  ed il loro prodotto PIP<sub>2</sub>, rivestono un ruolo centrale nella formazione e turnover delle adesioni focali e nella regolazione delle proteine citoscheletriche. Ho pertanto trasfettato cellule MDCK (e MDCK ts-v-*Src*) con il dominio PH della PLC $\delta$  coniugato con GFP e ho quindi sottoposto le cellule a stimoli diversi di movimento (trattamento con HGF o attivazione di v-*Src*, che inducono EMT) e adesione (distacco e ripiastramento su specifica matrice extracellulare). Le cellule sono state quindi fissate ed osservate al microscopio confocale.

Cellule "resting", di controllo, presentano una distribuzione del PIP<sub>2</sub> uniforme lungo tutta la membrana plasmatica di una cellula al bordo della colonia, nel citoplasma, nel nucleo e ai contatti cellula-cellula. Con lo stimolo di un fattore di scatter come HGF o di un oncogene trasformante come v-*Src* le colonie di MDCK disaggregano e le cellule stesse assumono un fenotipo "scatterato" ricco di ruffles e fibre di stress. In queste condizioni, la marcatura dell'actina mediante colorazione con falloidina fluoresceinata delimita i bordi cellulari definiti dall'actina corticale e evidenzia le direzioni di movimento segnate dalle fibre di stress. In cellule "scatterate" il PIP<sub>2</sub> presente sulla membrana plasmatica si concentra nelle medesime zone più intensamente marcate dall'actina corticale (ruffles) e si possono notare anche punti discreti di citoplasma in cui è presente un'alta concentrazione di PIP<sub>2</sub>, spesso in colocalizzazione con actina. L'identificazione di questi punti con vescicole è plausibile, considerando che nel fronte di una cellula che avanza esiste un continuo riciclo di membrana e delle molecole di adesione e recettoriali che questa contiene. In questo modo la cellula capta i segnali esterni e direziona il suo movimento. Tuttavia, senza l'osservazione di una colocalizzazione con specifici marcatori del comparto endosomale non è possibile sostenere con fermezza una tale identificazione. In queste condizioni, se si inibisce  $\alpha$ Dgk con il suo inibitore farmacologico R59949, la cellula continua a "fare ruffles", dato già noto, anche se il risultato finale dell'inibizione di  $\alpha$ Dgk è di bloccare completamente il movimento. Per quanto riguarda il PIP<sub>2</sub>, non si notano drastiche variazioni nella sua localizzazione, sebbene potrebbe essere azzardata l'osservazione di una ridotta localizzazione in membrana. Ritengo che osservare cellule fissate a diversi tempi di stimolazione non sia sufficiente e che il limite di queste osservazioni sia da ricercarsi nella microscopia confocale "statica": le variazioni della composizione della membrana del lamellopodio e l'internalizzazione di porzioni di essa sono eventi che richiederebbero l'uso della tecnologia time-lapse per apprezzarne la dinamica e le eventuali perturbazioni.

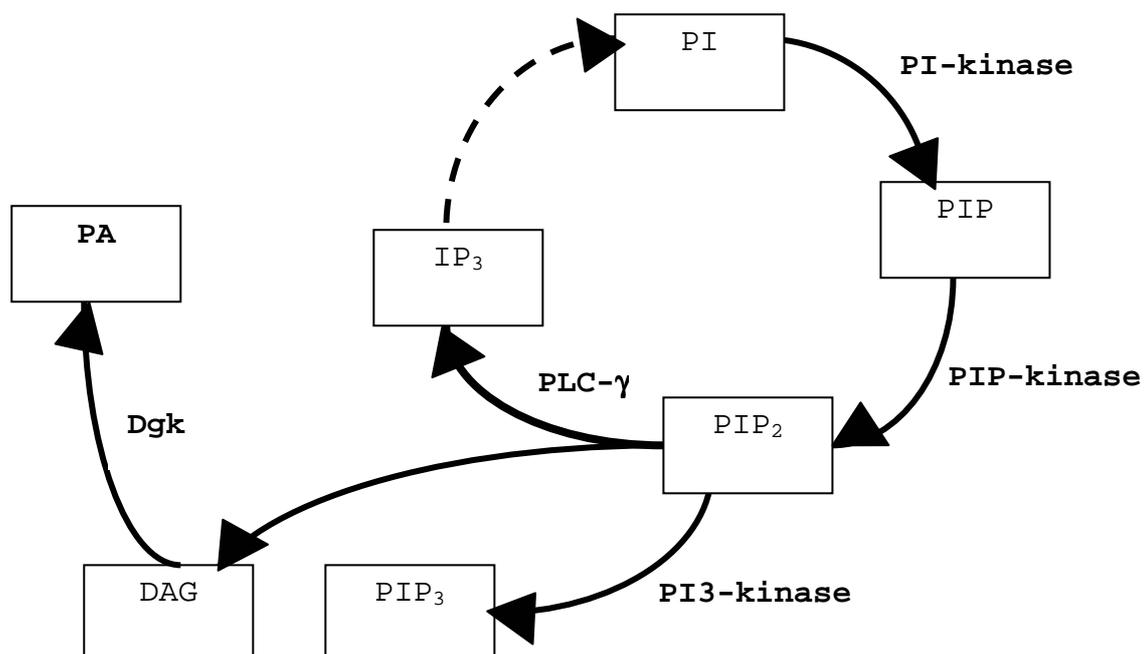
Per quanto riguarda l'adesione, tenendo presente che l'inibizione di  $\alpha$ Dgk riduce lo spreading di MDCK su matrice extracellulare, ho osservato le cellule in seguito a distacco ripiastramento su fibronectina (FN), in presenza o assenza di R59949. In cellule piastrate su polilisina (PL), dove si "attaccano" aspecificamente per attrazione fra le cariche negative della superficie cellulare e le cariche positive della polilisina stessa, il PIP<sub>2</sub> è distribuito uniformemente nel citoplasma e marca in membrana in modo specifico solo i

punti di contatto fra una cellula e l'altra. In seguito ad adesione su matrice cellulare specifica (PL+FN) invece, le cellule fanno spreading, accrescendo la loro superficie, e creano nuove adesioni focali soprattutto ai bordi cellulari. Il PIP2 risulta particolarmente concentrato proprio in queste zone della membrana plasmatica. In presenza dell'inibitore di  $\alpha$ Dgk, il PIP2 non si ritrova alla membrana plasmatica, ma viene completamente trattenuto nel citoplasma. Questa osservazione è rilevante ai fini di spiegare la ragione per cui cellule prive di attività  $\alpha$ Dgk presentano un ridotto spreading, ma impone di osservare più da vicino cosa accade ad adesioni e complessi focali e alla localizzazione ed attività della PIPK stessa.

### Quantificazione dei livelli PIP2

Non avendo potuto apprezzare variazioni sostanziali nella localizzazione del PIP2 in cellule stimulate con HGF in presenza dell'inibitore di  $\alpha$ Dgk, ho tentato un approccio alternativo per cogliere dati eventualmente sfuggiti alla prima osservazione: ho effettuato una quantificazione dei livelli dei fosfoinositidi totali di una cellula in seguito a stimolazione con HGF in presenza o meno di R59949.

In letteratura è documentato che in seguito a cascate di fosforilazioni in tirosina il livello del PIP2 cellulare si innalza, mentre rimane sostanzialmente inalterato quello di fosfatidilinositolo (PI), che costituisce il maggior pool cellulare di fosfoinositidi (21). Per eseguire questo esperimento ho marcato all'equilibrio con inositolo triziato ( $[^3\text{H}]\text{-Ins}$ ) le cellule in modo che tutti i fosfatidilinositoli di cellule "resting" fossero rilevabili; ho quindi stimolato le cellule con HGF in presenza o meno di R59949, ho estratto i lipidi e li ho separati mediante TLC. Ho suddiviso la corsa di ciascun campione in 20 frazioni ed ho quantificato le conte per minuto (cmp) di ciascuna frazione; grazie alla posizione di lipidi purificati utilizzati come standard di riferimento, ho identificato le frazioni corrispondenti al PI, PIP e PIP2. In questo modo ho potuto osservare le rispettive variazioni nei tre pool intracellulari, indotte dai trattamenti. Si noti la relazione esistente fra i tre pool e fra questi ed altri importanti lipidi segnale:



Ho rilevato che la stimolazione con HGF di cellule epiteliali umane HaCat genera un aumento del pool intracellulare di PIP2, la cui consistenza è ulteriormente incrementata dall'inibizione di  $\alpha$ Dgk. Se il PA prodotto da  $\alpha$ Dgk stimolasse l'attività della PIPK-I  $\alpha/\gamma$ , mi aspetterei che, mancando questo stimolo, la produzione di PIP2 diminuisse. L'osservazione sperimentale si presta ad una interpretazione alternativa a quella che vorrebbe la PIPK-I  $\alpha/\gamma$  come target del PA prodotto da  $\alpha$ Dgk: in letteratura è documentato che anche la PLC $\gamma$  è stimolata da PA (22). La mancanza di PA in seguito a blocco di  $\alpha$ Dgk genererebbe una riduzione dell'attività di PLC $\gamma$  ed un conseguente accumulo di PIP2. Ci riproponiamo di approfondire questa ipotesi con ulteriori esperimenti.

### **Localizzazione di $\alpha$ Dgk e di PIPK-I $\alpha$**

Ho approfondito la possibile relazione fra  $\alpha$ Dgk e PIPK-I $\alpha$  osservandone la localizzazione subcellulare al microscopio confocale.

Per quanto riguarda  $\alpha$ Dgk, ho trasfettato transientemente cellule MDCK con il mutante GFP- $\alpha$ Dgk e ho stimolato le cellule con HGF. In cellule di controllo  $\alpha$ Dgk si trova diffusa nel citoplasma, mentre in seguito a trattamento con HGF essa trasloca alla membrana del lamellopodio.

Trasfettando invece le cellule con myc/His-PIPK-I $\alpha$ , ho potuto osservare come questo enzima localizzi nel citoplasma, ai contatti cellula-cellula e sulla membrana plasmatica anche in cellule di controllo. In seguito a stimolazione con HGF si nota un accumulo di myc/His-PIPK-I $\alpha$  ai lamellipodi in corrispondenza dell'actina corticale.

Se si cotrasfettano in MDCK GFP- $\alpha$ Dgk e myc/His-PIPK-I $\alpha$ , l'osservazione più rilevante è quella della diffusa colocalizzazione delle due proteine alla membrana plasmatica in seguito a stimolazione con HGF *e in zone discrete del citoplasma*.

Mi ripropongo di osservare la localizzazione di PIPK-I $\alpha$  in seguito a trattamento con HGF anche in presenza dell'inibitore di  $\alpha$ Dgk, per testare se la localizzazione delle due proteine possa dipendere dall'attività di almeno una di esse. Ho intenzione inoltre di saggiare l'esistenza di un'interazione, diretta o meno, fra le due proteine, sovraesprese in cellule COS, mediante coimmunoprecipitazione.

### **$\alpha$ Dgk riduce la localizzazione della paxillina alle adesioni focali**

Per osservare più da vicino l'influenza di  $\alpha$ Dgk nel turnover delle FA, ho osservato al microscopio confocale la localizzazione della paxillina, proteina strutturale che trasloca alle adesioni focali in formazione e che deve essere degradata per il loro disassemblamento.

In cellule di controllo, la paxillina si ritrova prevalentemente nel citoplasma, mentre in seguito a trattamento con HGF localizza alla membrana in corrispondenza delle FA, specialmente in corrispondenza dei punti di ancoraggio delle fibre di stress. In presenza dell'inibitore di  $\alpha$ Dgk si nota una certa disorganizzazione delle fibre di stress ed una ridotta localizzazione della paxillina alle adesioni focali del lamellopodio. Un difetto nel turnover delle adesioni focali potrebbe spiegare il difetto di motilità nelle cellule in cui l'attività di  $\alpha$ Dgk è inibita.

### **$\alpha$ Dgk riduce l'attivazione di Rac**

Dato il ruolo centrale delle small G-protein della famiglia di Rho nel movimento cellulare, dato il fatto che  $\alpha$ Dgk e Rac sono state ritrovate in un medesimo complesso multimolecolare e dato il legame esistente fra la localizzazione della paxillina e la

formazione di ruffles dipendenti da Rac, ho voluto testare lo stato di attivazione di Rac in seguito a trattamento con HGF in presenza o meno di R59949. L'attività di Rac è stata saggiata attraverso il pull-down della forma legata al GTP (attiva) mediante la proteina di fusione GST-PAK CD, che comprende il dominio regolatorio CRIB di PAK, legante Rac attivo.

In cellule MDCK, il trattamento con HGF induce un'attivazione transitoria di Rac che presenta il suo picco a 15' (23): ho dunque scelto il punto a 15' per effettuare le mie osservazioni. In 4 esperimenti indipendenti ho potuto constatare che l'inibizione di  $\alpha$ Dgk riduce il grado di attivazione di Rac. Il modello che si va delineando presenta dunque  $\alpha$ Dgk come enzima regolatorio di eventi a monte di Rac, sebbene l'attivazione di quest'ultimo non dipenda esclusivamente dall'attività di  $\alpha$ Dgk. Sarà importante inoltre saggiare l'attività di altre small G-protein e specialmente di RhoA, che presiede alla formazione delle fibre di stress e alla maturazione dei complessi focali in adesioni focali stabili.

***(Per l'osservazione "visiva" dei risultati si rimanda alla presentazione orale)***

## **PROSPETTIVE FUTURE**

Riassumo qui quanto già espresso nel commento dei risultati ottenuti:

- Utilizzo della metodica time-lapse per l'osservazione fine della distribuzione del PIP2 in cellule epiteliali sottoposte a stimolo con HGF o v-Src, in presenza o meno dell'inibitore di  $\alpha$ Dgk. Tale metodica risulterà utile anche per seguire la localizzazione di  $\alpha$ Dgk e di proteine delle adesioni focali.
- Approfondimento della relazione fra  $\alpha$ Dgk e PIPK- $\alpha$ , mediante sovraespressione delle due in cellule COS e tentativo di coimmunoprecipitazione.
- Osservazione della dipendenza da  $\alpha$ Dgk dell'attività di RhoA in seguito a stimoli come fattori di crescita o adesione.
- Verifica dell'ipotesi che il target del PA prodotto da  $\alpha$ Dgk sia la PLC $\gamma$ : coimmunoprecipitazione delle due proteine e osservazione della trasduzione a valle di PLC $\gamma$ .
- Cambiamento del modello cellulare (MDCK) attualmente utilizzato nella maggior parte degli esperimenti, per spostarsi verso un adeguato modello epiteliale di cellule umane che permetta l'osservazione delle proteine endogene.

## **MATERIALI E METODI**

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

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

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

### **Reagenti:**

R59949 (Sigma) è stato utilizzato, a meno di indicazione contraria, alla concentrazione di 1 $\mu$ M.

rhHGF (Peprotech), disciolto in PBS 1% di BSA ad una concentrazione finale di 1ng/ $\mu$ l, attivato mediante l'incubazione overnight a 37°C con il 5% di FBS è stato utilizzato, a meno di indicazione contraria, alla concentrazione finale di 50 ng/ml.

Anti-Rac1 e anti-paxillin da BD Transduction Laboratories.

Anti-myc clone 9E10 da Sigma, Santa Cruz Biotechnology o BD Transduction Laboratories.

Anti-paxillin coniugato FITC da BD Transduction Laboratories.

Alexa Fluor 456 Falloidin da Molecular Probes.

Anticorpi secondari anti- mouse o rabbit IgG, coniugati FITC, da DAKO.

### **Plasmidi e vettori utilizzati:**

GFP-PH PLC $\delta$  è stato gentilmente offerto dal Dott. Marco Falasca, Londra, UK.

GFP- $\alpha$ Dgk è stato ottenuto dal vettore PMT2-myc- $\alpha$ Dgk mediante Gateway Technology (Invitrogen).

myc/His-PIP1 $\alpha$  è stato gentilmente offerto da Matthew K. Topham, Salt Lake City, USA

pGEX PAK-CD, codificante il PAK-CRIB domain, è stato gentilmente offerto da S. Degani, Torino

### **Stimolo di adesione alla matrice extracellulare:**

Il distacco delle cellule MDCK è avvenuto con PBS al 4mM di EDTA e 1mM di EGTA per un tempo di 40-45' a 37°C e la raccolta delle cellule è stata effettuata senza l'utilizzo dello scraper. I punti "sospesi" sono costituiti dall'adesione a polilisina, mentre per i punti "adesi" le cellule sono state fatte aderire su matrice extracellulare (fibronectina o laminina) + polilisina.

Il coating dei vetrini per l'adesione è stato effettuato overnight a 4°C o per 2-3h a 37°C mediante soluzione di PBS con fibronectina o laminina o polilisina, ciascuna 10 µg/ml.

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

Cellule MDCK ed HaCat sono state piastrate su vetrini in piastre da 24 pozzetti, coltivate fino ad un appropriato grado di confluenza e quindi eventualmente trasfettate. Prima della stimolazione sono state poste in assenza di siero per una notte. Quando necessario, le cellule sono state pretrattate con R59949 per 15' prima della stimolazione e per tutto il tempo della stimolazione stessa.

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

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

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

Per ottenere la proteina di fusione GST-PAK CRIB, *Escherichia coli* TOPF 10 sono stati trasformati con il costrutto pGEX PAK-CD; dopo una crescita overnight in 50 ml di LB, la coltura è stata diluita 1:10 in LB fresco e fatta crescere fino ad una densità ottica di 0.5/0.6. E' stata quindi indotta l'espressione della proteina ricombinate con l'aggiunta di IPTG 0.1 mM per 2 ore. Le cellule sono state quindi raccolte mediante centrifugazione a 4°C, risospese in ghiaccio in 10 ml di GST-Bacteria l Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 0.1% Triton X-100) supplementato con 1mM DTT, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e AEBSF, EDTA, Bestatina, E-64, Leupeptina e Aprotinina contenuti nel Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) e quindi sonicate. Il lisato batterico è stato chiarificato mediante centrifugazione, suddiviso in aliquote da 1ml, cingelato in azoto liquido e conservato a -80°C. La proteina ricombinante è stata purificata "fresca" il medesimo giorno dell'esperimento mediante incubazione di 1 ora a 4°C con una resina GSH-sefaroso (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, Amersham), seguita da 3 lavaggi con GST-FISH Buffer (10% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 2mM MgCl<sub>2</sub>), supplementato come il precedente. La quantità di proteina ricombinante ottenuta è

stata stimata, dopo separazione in SDS-PAGE e colorazione con EZBlue (Sigma), mediante comparazione con quantità standard di BSA. La taglia della banda GST-PAK CD è di circa 60 Kd.

Per l'esperimento vero e proprio, le MDCK sono state piastrate in piastre da 15 cm di diametro e poste in terreno senza FBS per 24 ore prima della stimolazione con 100 U/ml di HGF per 15'. Quando utilizzato, R59949 è stato somministrato con un pre-trattamento di 15' e per tutta la durata della stimolazione. Le cellule sono state quindi lavate con PBS freddo e lisate per 5' in ghiaccio con GST-FISH Buffer. Il lisato è stato chiarificato con una centrifugata di 5' a 4°C. Il supernatante è stato quindi incubato per 45' a 4°C con una quantità appropriata di GST-PAK CRIB, precedentemente fatto accoppiare con biglie di GSH-sefaroso. Le biglie sono state quindi lavate 3 volte con GST-FISH Buffer e le proteine sono state eluite mediante bollitura in Laemly Buffer. I campioni sono stati quindi separati in SDS-PAGE al 15% di acrilammide e la presenza di Rac è stata rilevata in Western Blot utilizzando l'anticorpo anti-Rac1. Le variazioni nello stato di attivazione di Rac fra i vari campioni sono state valutate comparando il rapporto RacGTP/Rac totale. I valori di RacGTP e Rac totale sono stati ottenuti mediante densitometria delle bande corrispondenti in Western Blot.

### **Misurazione dei livelli intracellulari dei fosfoinositidi:**

Cellule HaCat coltivate in piastra da 10 cm di diametro sono state marcate all'equilibrio (per 48 ore) in Labeling Medium (M-199 al 2% FBS con myo-[<sup>3</sup>H]inositolo, antibiotici, antimicotici e glutammina). Al termine della marcatura le cellule sono state lavate in PBS e i trattamenti sono stati eseguiti in DMEM senza FBS.

In seguito ai trattamenti le cellule di ciascuna piastra sono state raccolte mediante scraping in 1.5 ml di HCl 2.4 M. La separazione dei lipidi è stata eseguita mediante l'aggiunta di 5 ml totali di cloroformio:metanolo:HCl concentrato in proporzioni 200:100:0,75; in seguito a vortex le fasi sono state separate mediante centrifugazione per 2' a 1000 rpm. La fase sottostante è stata trasferita in nuovi tubi da 15 ml ed è stata lavata con metanolo:HCl 1N in proporzione 1:1 con un volume pari a quello della fase estratta. Dopo nuova separazione delle fasi, quella dei lipidi in cloroformio è stata portata a secco in atmosfera di azoto e i lipidi sono stati risospesi in 80 µl di cloroformio. I campioni così risospesi sono stati depositati su lastre da TLC di silice-alluminio coattate come per il Dgk-assay (vedere relazione dello scorso anno) e la separazione è avvenuta con una miscela cloroformio:metanolo:H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH in proporzioni 60:47:11:1,8. Accanto ai campioni sono stati caricati degli standard purificati di PIP<sub>2</sub>, PIP e PI e la migrazione dei diversi lipidi (campioni + standard) è stata rilevata mediante colorazione con iodio molecolare. La corsa di ciascun campione è stata quindi ritagliata in 20 frazioni di 6 mm x 6 mm e ciascuno di essi è stato posto in liquido di scintillazione e "contato" al β-counter per 10'. I dati ottenuti sono stati analizzati ponendo particolare attenzione al totale delle conte nelle 20 frazioni di ciascun campione e nelle frazioni corrispondenti ai lipidi di interesse.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Topham M e Prescott S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11447-50.
2. Flores I, Casaseca T, Martinez AC, Kanoh H, Merida I. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10334-10340.
3. Sanjuan MA, Jones DR, Izquierdo M and Merida I. (2001) *J Cell Biol.* **153**(1):207-20.
4. Cutrupi S, Baldanzi G, Gramaglia D, Maffe A, Schaap D, Giraudo E, van Blitterswijk W, Bussolino F, Comoglio PM, Graziani A. (2000) *EMBO J.* **19**, 4614-22
5. Baldanzi G, Mitola S, Cutrupi S, Filigheddu N, van Blitterswijk WJ, Sinigaglia F, Bussolina F, Graziani A (2004), *Oncogene*, 1-11.
6. Ciprés A, Carrasco S, Merino E, Diaz E, Krishna UM, Falck JR, Martinez-A C, Mérida I (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 35629-35.
7. Boyer B, Vallés AM, Edme N (2000) *Biochemical Pharmacology* **60**, 1091-99.
8. Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) *Cell* **84**(3), 359-69.
9. Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA (2003) *J. Membrane Biol.* **194**, 77-89.
10. Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris J, Frohman A, Kanaho Y (1999) *Cell* **99**, 521-532.
11. Burridge K e Wennerberg K (2004) *Cell* **116**, 167-179.
12. Doughman RL, Firestone AJ, Wojtasiak ML, Bunce MW, Anderson RA (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 23036-45.
13. Ling K, Doughman RL, Firestone AJ, Bunce MW, Anderson RA (2002) *Nature* **420** 89-93.
14. Ling K, Doughman RL, Iyer VV, Firestone AJ, Bairstow SF, Mosher DF, Shaller MD, Anderson RA (2003) *The Journal of Cell Biology* **163**, 1336-49.
15. Di Paolo G, Pellegrini L, Letinic K, Cestra G, Zoncu R, Voronov S, Chang S, Guo J, Wenk MR, De Camilli P (2002) *Nature* **420**, 85-89.
16. Jenkins GH, Fiset PL, Anderson RA. (1994) *J Biol Chem.* **269**, 11547-54

17. Tolias KM, Couvillon AD, Cantley LC, Carpenter CL (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 762-70.
18. Luo B, Prescott SM, Topham MK (2004) *Cellular Signalling* **16**, 891-97
19. Chatah NEH, Abrams CS (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34059-65.
20. Lamorte L, Royal I, Naujokas M, Park M (2002) *Molecular Biology of the Cell* **13**, 1449-61
21. Rumenapp U, Schmidt M, Olesch S, Ott S, von Eichel-Streiber C, Jakobs HK (1998) *Biochemical Journal* **334**, 625-631
22. Jones GA, Carpenter G (1993) *J. Biol. Chem.* **258**, 20345-60
23. Royal I, Lamarche-Van N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M (2000) *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1709-25.

## **ALLEGATO 1:**

### **ELENCO DEI SEMINARI SEGUITI DURANTE IL II ANNO**

- Prof Magnus Ingelman-Sundberg

Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stoccolma

PHARMACOGENETICS: A TOOL FOR A MORE EFFICIENT AND SAFE DRUG THERAPY

- Rita Clementi

Universita'diPavia

ALTERAZIONI DEL GENE DELLA PERFORINA NELLE PATOLOGIE LINFOPROLIFERATIVE

- **Dr.ssa Bice Chini**

CNR Istituto di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia cellulare e molecolare, Milano  
LIPID RAFTS E RECETTORE PER L' OSSITOCINA: MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

- Prof. Guido Valesini

Cattedra di Reumatologia, Universita' la Sapienza di Roma  
TNF, ANTI-TNF ED AUTOIMMUNITÀ

- Dr Antonia Follenzi

Albert Einstein College of Medicine, Liver Research Center (1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461 – USA)

ESPRESSIONE EPATO-SPECIFICA DEL FATTORE IX ANTIEMOFILICO MEDIANTE L'USO DI VETTORI LENTIVIRALI

- Frédéric RIEUX-LAUCAT

INSERM 429, Hôpital Necker, Paris

GENETIC BASES OF THE AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME (ALPS) SUBTYPES

- Prof. Angiolo Benedetti

Dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale dell'Università di Siena  
IL RETICOLO ENDOPLASMATICO: UN LABIRINTO METABOLICO

- *Antonio Puccetti*

*Università di Genova*

*VIRUS E MALATTIE AUTOIMMUNI*

- *Alberto Martini*

*Istituto Scientifico Gaslini e Università di Genova*  
**LE ARTRITI CRONICHE DEL BAMBINO**

- Prof. Christopher Day

Centre for Liver Research, Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK  
**PITFALLS OF GENETIC STUDIES IN LIVER DISEASE**

- *Manlio Ferrarini*

*IST e Università di Genova*

**MECCANISMI PATOGENETICI DELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**

- Prof. Martin Ronis

Arkansas Children's Nutrition Center, Dept of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, USA.  
**ETHANOL METABOLISM AND TOXICITY IN PREGNANCY**

- Prof. Martin O. Savage

General Secretary of European Society for Paediatric Endocrinology

*Department of Endocrinology, St. Bartholomew's Hospital and the Royal School of Medicine and Dentistry, London*

**CUSHING'S SYNDROME IN CHILDHOOD**

- Dott. Marco Brambilla

**NORME OPERATIVE DI PROTEZIONE E SICUREZZA PER I LABORATORI DI RICERCA**

- Dr. ssa Luisa Pugliese

**ANALISI DI SEQUENZE E STRUTTURE DI PROTEINE SU LARGA SCALA: UNA NUOVA TECNOLOGIA PER INTERPRETARE DATI ORIGINATI DI GENOMICA E PROTEOMICA E OTTIMIZZARE LA SELEZIONE DEGLI OBIETTIVI FARMACOLOGICI**

- Dr Anne Boullerne

University of Chicago, Department of Neurology (MC 20305841 S. Maryland Ave. Room J220, Chicago, IL 60637 – USA)

**PROLIFERATION OF HUMAN OLIGODENDROCYTE PROGENITORS FROM THE ADULT BRAIN IN LONG-TERM CULTURE and MULTIPLEX ROLE OF NITRIC OXIDE IN MULTIPLE SCLEROSIS**

- **Dr David Murphy**

**FUNCTIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITY**

- **Dr David Murphy**

**BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS: PRINCIPLES, PROSPECTS AND PROBLEMS**

- **Prof Emilio Hirsch**

**Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino**

**LA FOSFATIDIL-INOSITOLO 3-CINASI  $\gamma$  REGOLA LA CONTRATTILITA' E L'IPERTROFIA CARDIACA MEDIANTE FUNZIONI DIPENDENTI E INDIPENDENTI DALLA ATTIVITA' LIPIDE-CINASICA**

## ALLEGATO 2:

# ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI, ELENCO DEGLI ABSTRACT E DELLE PARTECIPAZIONI A CONGRESSI PER L'A.A. 2003-2004

### Articoli pubblicati:

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

### Articoli in preparazione:

Baldanzi G, Cutrupi S, **Chianale F**, Panico Guercia R, Loggia E, Notario M, Gnocchi V, Filigheddu N, Santoro M, vanBlitterswijk, Sinigaglia F and Graziani A. "*Dkg-alpha is involved in HGF and v-Src -mediated epithelial mesenchymal transition*"

### Comunicazioni a congressi:

ABCD 2004, Hotel Farnese, Roma:

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

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

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

- ANBI 2004 - Villa Gualino, Torino:

DIACILGLICEROLO CINASI- $\alpha$  ( $\alpha$ DGK) E FOSFATIDILINOSITOLO-4-FOSFATO 5-CINASI

(PI4P-5K): PROGETTO PER LO STUDIO DI UN POSSIBILE CROSSTALK.

**F. Chianale**, S. Cutrupi, G. Baldanzi, P. Mirabelli, F. Maccarini, F. Pontiroli, A. Graziani.

- FISV 2004 - Palacongressi, Riva del Garda

*DIACYLGLYCEROL KINASE-ALPHA IS INVOLVED IN REGULATION OF CELL ADHESION TO EXTRACELLULAR MATRIX*

**F. Chianale**, S. Cutrupi, G. Baldanzi, G. Brignoli, L. Moro and A. Graziani

- FISV 2004 - Palacongressi, Riva del Garda

*PROTEOMIC ANALYSIS OF  $\alpha$ -DIACYLGLYCEROL KINASE ASSOCIATED PROTEINS AND EFFECTORS*

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

- SIC "XLVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia" - Pisa 2004  
*DIACYLGLYCEROL KINASE- ALPHA IS INVOLVED IN HGF-INDUCED INVASION OF MAMMARY CELLS*

Santina Cutrupi, Viola Gnocchi, Fortina Elisabetta, Piantanida Paola, Gianluca Baldanzi, **Federica Chianale**, Nicoletta Filigheddu, Nicola Surico, Andrea Graziani

- Lussemburgo, gennaio 2004  
*DIACYLGLYCEROL KINASE- $\alpha$  IS A POTENTIAL TARGET FOR ANGIOGENESIS AND METASTASIS CONTROL*  
Gianluca Baldanzi, Stefania Mitola, Santina Cutrupi, Nicoletta Filigheddu, **Federica Chianale**, Federica Pontiroli, Federica Maccarini, Wim J van Blitterswijk, Fabiola Sinigaglia, Federico Bussolino, Andrea Graziani

- 1st italian RNA interference symposium - Milano, 2004  
*NEW TOOLS FOR  $\alpha$ -DGK INHIBITION.*  
G. Baldanzi, S. Mitola, S. Cutrupi, N. Filigheddu, **F. Chianale**, V. Gnocchi, A. Graziani.

- FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference, Cavtat (Croatia) 2004  
*HGF- AND V-SRC-INDUCED ACTIVATION of  $\alpha$ -DIACYLGLYCEROL KINASE ARE REQUIRED FOR EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION*  
S. Cutrupi, **F. Chianale**, P. Mirabelli, G. Baldanzi, N. Filigheddu, V. Gnocchi, A. Graziani.

- Workshop Molecular advances in DAG signaling - Madrid (Spain) 2004  
*MECHANISM OF ACTIVATION AND ROLE OF ALPHA-DIACYLGLYCEROL KINASE IN HGF SIGNALING IN EPITHELIAL CELLS.*

Cutrupi, Baldanzi, **Chianale**, Filigheddu, Gnocchi and Graziani

- BioScience2004, from molecules to organisms - Glasgow (Scozia) 2004  
 *$\alpha$ DIACYLGLYCEROL KINASE IS A POTENTIAL TARGET FOR ANGIOGENESIS AND METASTASIS CONTROL*  
Baldanzi GL., Mitola S., Cutrupi S., **Chianale F.**, van Blitterswijk W, Bussolino F., Graziani A.

- EMBO workshop Lymphocyte antigen receptor and coreceptor signaling - Certosa di Pontignano, Siena 2004  
 *$\alpha$ -DIACYLGLYCEROL KINASE IS ACTIVATED BY SRC AND GROWTH FACTORS THROUGH TYROSINE PHOSPHORYLATION.*  
Gianluca Baldanzi, Santina Cutrupi, **Federica Chianale**, Paola Mirabelli, Federica Pontiroli, Federica Maccarini, Andrea Graziani.

- 5° Convegno FISV (2003) - Palacongressi di Rimini

*GHRELIN AND DES-ACYL GHRELIN INDUCE DIFFERENTIATION OF C2C12 MYOBLASTS.*

Filigheddu N., Cappelli M., Gnocchi V., Cutrupi S., Baldanzi G., **Chianale F.**, Prat M. and Graziani A.

- 5° Convegno FISV (2003) - Palacongressi di Rimini

*ACTIVATION OF DIACYLGLYCEROL KINASE ALPHA IS REQUIRED FOR VEGF-INDUCED ANGIOGENIC SIGNALING IN VITRO.*

**Chianale F.**, Baldanzi G., Mitola S., Cutrupi S., Filigheddu N., van Blitterswijk W.J., Sinigaglia F., Bussolino F. and Graziani A.

- 5° Convegno FISV (2003) - Palacongressi di Rimini

*ACTIVATION OF DIACYLGLYCEROL KINASE-ALPHA IS REQUIRED FOR HGF- AND V-SRC INDUCED EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION.*

Cutrupi S., Mirabelli P., Baldanzi G., **Chianale F.**, Pedrotti R., Loggia E., Notario M., Panico-Guercia R., van Blitterswijk W.J. and Graziani A.

- 5° Convegno FISV (2003) - Palacongressi di Rimini

*$\alpha$ -DIACYLGLYCEROL KINASE INTERACTION WITH SRC AND ITS PHOSPHORYLATION ON TYROSINE 335 ARE REQUIRED FOR HGF-INDUCED CELL MOTILITY.*

Baldanzi G., Cutrupi S., **Chianale F.**, Filigheddu N., van Blitterswijk W.J., Sinigaglia F. and Graziani A.

- Special FEBS - Meeting on Signal Transduction - Bruxelles (Belgio) 2003.

*GHRELIN AND DES-ACYL GHRELIN INDUCE DIFFERENTIATION OF C2C12 MYOBLASTS.*

N. Filigheddu, M. Cappelli, V. Gnocchi, S. Cutrupi, G. Baldanzi, **F. Chianale**, A. Graziani.

- IHUPO - Napoli 2003

*PROTEOMIC ANALYSIS OF  $\alpha$ -DIACYLGLYCEROL KINASE ASSOCIATED PROTEINS AND EFFECTORS*

Baldanzi GL, Cutrupi S, **Chianale F.**, Filigheddu N., Gnocchi V, Sinigaglia F. and Graziani A.

#### **Altre partecipazioni a convegni:**

- Convegno annuale, sezione lombardo-ligure-piemontese, della Società di Biochimica e Biologia Molecolare "SIB 2004", Novara maggio 2004.

- Seminario di cultura brevettuale, Novara 23 aprile 2004.

- **Convegno "Proteomica - una tecnica per molte applicazioni", Busto Arsizio 6 febbraio 2004.**

- **Biomateriali e applicazioni biomedicali, innovazione e nuove tecnologie, Torino 3 dicembre 2003.**