

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE
UNIVERSITA' DEL PIEMONTE ORIENTALE "A. AVOGADRO"
XVIII CICLO-DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

Relazione del secondo anno

**MECCANISMI MOLECOLARI
RESPONSABILI DELLA REGOLAZIONE NEGATIVA
DEL RECETTORE TIROSINA CHINASI RON**

Dottoranda: **Serena Germano**

Tutore: **Prof. G. Gaudino**



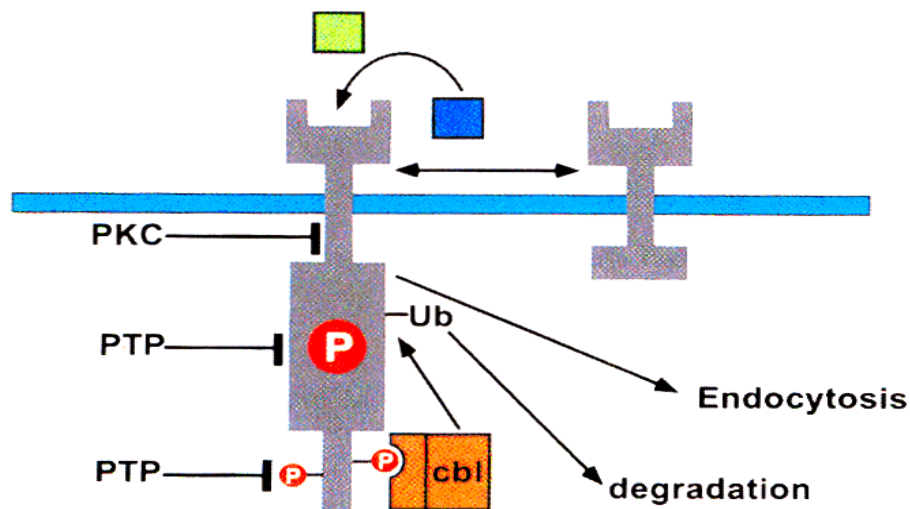
INTRODUZIONE

Il legame di fattori di crescita ai recettori ad attività tirosin chinasi (RTKs) determina la trasduzione di segnali intracellulari implicati nel controllo della sopravvivenza, della proliferazione e del differenziamento.

Parallelamente i recettori attivati iniziano una complessa cascata di eventi di regolazione negativa che modula l'intensità e la durata delle risposte intracellulari.

Un corretto equilibrio tra segnali positivi e negativi è fondamentale per l'omeostasi cellulare: la prevalenza di segnali positivi determina uno stato di prolungata stimolazione cellulare correlato allo sviluppo di patologie neoplastiche e malattie autoimmuni, mentre la predominanza di segnali negativi è associata a patologie caratterizzate da immunodeficienza (Bache *et al.*, 2004; Dikic & Giordano, 2003).

L'esito della segnalazione negativa è l'attenuazione transitoria o definitiva della trasmissione del segnale.

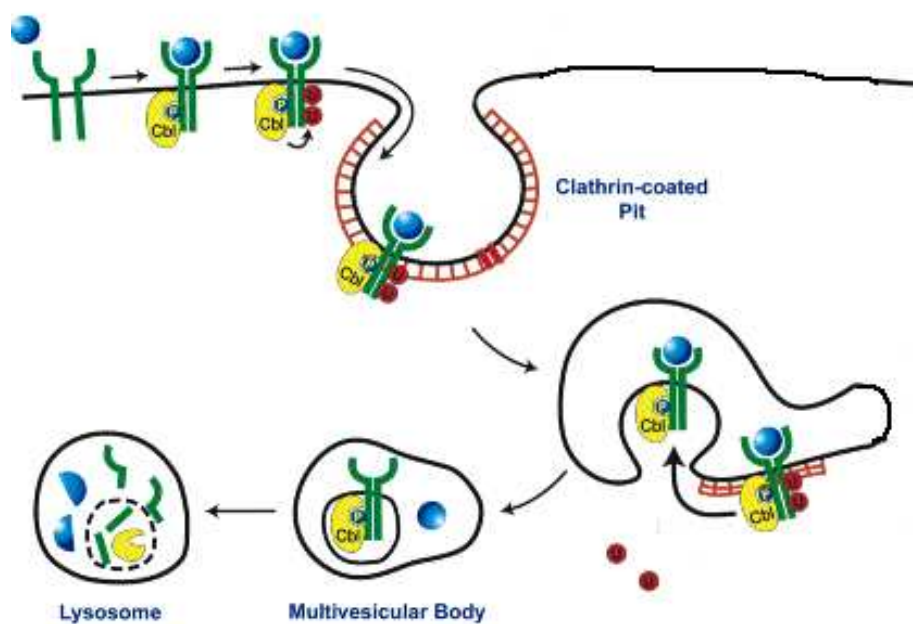


(Schlessinger *et al.*, 2000)

Esistono molteplici meccanismi di attenuazione transitoria che intervengono nella regolazione della durata e dell'ampiezza delle risposte intracellulari, tra i quali compartimentalizzazione degli effettori, modificazioni post-traduzionali e inibizione

dell'attività catalitica attraverso la defosforilazione mediata da specifiche fosfatasi (Schlessinger, 2000).

La terminazione definitiva del segnale è mediata, invece, dalla degradazione proteica. Il modello generale di inibizione irreversibile dell'attività dei RTKs prevede la rapida diminuzione dei recettori attivati esposti in membrana ("down-regulation"), attraverso l'accelerazione dell'endocitosi mediata da vescicole di clatrina e il successivo indirizzamento delle proteine internalizzate al compartimento degradativo lisosomiale (Waterman & Yarden, 2001).



Il prodotto del proto-oncogene *RON* è un recettore ad attività tirosina chinasi appartenente alla sottofamiglia del recettore dell'HGF (Hepatocyte Growth Factor). Il gene *RON* umano codifica una glicoproteina transmembrana sintetizzata come precursore a singola catena (pr170), successivamente tagliato a generare la forma matura del recettore (p185), un eterodimero costituito da una catena α extracellulare di 35 KDa e da una catena β transmembrana di 150 KDa, unite da un ponte disolfuro (Gaudino *et al.*, 1994). L'interazione del recettore con il suo ligando MSP (Macrophage Stimulating Protein) determina l'attivazione di molteplici vie di trasduzione del segnale coinvolte nel controllo della proliferazione, della migrazione e del differenziamento tra cui Ras/MAPK (Li *et al.*,

1995), PI-3K/Akt (Wang *et al.*, 1996), JNK/SAPK (Chen *et al.*, 2000), β -Catenin (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2001), NF- κ B (Santoro *et al.*, 2003a).

Evidenze sperimentali indicano il coinvolgimento di Ron nei processi di progressione tumorale e metastatizzazione. Il recettore interviene nella transizione epitelio-mesenchimale che caratterizza il processo di metastatizzazione (Thiery, 2002) e la sua attivazione *in vitro* determina dissociazione delle cellule epiteliali, migrazione ed invasione della matrice extracellulare (Wang *et al.*, 2003).

Sono stati documentati tre meccanismi, iperespressione, mutazioni puntiformi, delezioni, che possono determinare un'attivazione impropria della chinasi recettoriale (Maggiara *et al.*, 1998; Santoro *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003).

Recenti evidenze sperimentali indicano che l'attività di segnalazione di Ron è finemente modulata all'interno della cellula. E' stato dimostrato che la proteina fosfatasi PP1 è in grado di regolare negativamente la via di Akt/PKB attivata dal recettore in risposta all'MSP (Santoro *et al.*, 2003b).

Inoltre, studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il recettore attivato è in grado di reclutare l'ubiquitina ligasi E3 c-Cbl, noto regolatore negativo di molti recettori tirosina chinasi (Thien & Langdon, 2001). C-Cbl interagisce in maniera diretta con le tirosine recettoriali Y¹⁰¹⁷ e Y¹³⁵³ tramite il suo dominio PTB o in maniera indiretta, mediata dall'adattatore Grb2, promuovendo l'ubiquitinazione del recettore attivato (Thien & Langdon, 2001). Il ruolo di c-Cbl nell'ubiquitinazione indotta da ligando è stato dimostrato anche per altri RTKs, tra i quali l'EGFR (Levkowitz *et al.*, 1998), il PDGFR (Lee *et al.*, 1999), il CSF-1R (Miyake *et al.*, 1999) e l' HGFR (Peschard *et al.*, 2001).

L'ubiquitinazione indotta da ligando riveste un ruolo cruciale nella regolazione negativa dei RTKs, intervenendo nel meccanismo di "down-regulation" e di smistamento dei recettori internalizzate.

Il "pattern elettroforetico" dei RTKs ubiquitinati è caratterizzato da una strisciata dovuta alla presenza di forme a diverso peso molecolare, compatibile con una modificazione dovuta alla coniugazione di catene di ubiquitina (poliubiquitinazione) o all'addizione multipla di singole molecole a residui di lisina diversi (multiubiquitinazione).

E' stato dimostrato recentemente che l'EGFR e il PDGFR, in seguito ad attivazione indotta da ligando, risultano multiubiquitinati (Haglund *et al.*, 2003b; Mosesson *et al.*, 2003), e a questo tipo di modificazione è stato attribuito un ruolo cruciale nel controllo dell'indirizzamento dei recettori ubiquitinati al lisosoma attraverso l'interazione sequenziale con le molteplici proteine endocitiche (Epsin, Epsin-15, Hrs; Polo *et al.*, 2002) recanti motivi UIM (ubiquitin-interacting motifs).

Il sistema proteolitico del proteasoma 26S è, invece, principalmente deputato alla degradazione di proteine ^(Mastocytosis) citosoliche e nucleari. Evidenze sperimentali recenti dimostrano, tuttavia, che l'attività del proteasoma è richiesta per lo smistamento delle molecole internalizzate alla degradazione nel lisosoma (Hammond *et al.*, 2003; Alwan *et al.*, 2003). Recentemente è stato inoltre proposto per il recettore dell'eritropoietina (Epo-R) un meccanismo di degradazione sequenziale, che prevede l'intervento di entrambi i sistemi proteolitici (Walrafen *et al.*, 2004).

Non vi sono quindi evidenze di un processo degradativo che accomuna i recettori di membrana.

SCOPO DEL LAVORO

Nell'ambito del progetto di ricerca iniziato il primo anno di dottorato sulla caratterizzazione dei meccanismi coinvolti nella regolazione negativa del recettore Ron, il lavoro sperimentale, nel secondo anno, è stato indirizzato allo studio del ruolo dell'ubiquitinazione e dei principali sistemi proteolitici cellulari nella degradazione recettoriale. E' stata inoltre verificata l'importanza dell'integrità di questa modalità di regolazione negativa per la terminazione dei segnali attivati dal recettore in risposta all'MSP.

RISULTATI

Il recettore Ron attivato, diversamente da altri RTKs, è modificato tramite addizione di catene di poliubiquitina.

Recentemente è stato dimostrato che il tipo di ubiquitinazione a cui sono soggetti i recettori per il PDGF e per l'EGF in seguito a stimolazione è dovuto all'addizione multipla di singole molecole di ubiquitina (multiubiquitinazione) su diversi residui di lisina (Haglund *et al.*, 2003b; Mosesson *et al.*, 2003).

Poiché le diverse modalità di ubiquitinazione rappresentano segnali differenti per il destino metabolico delle proteine modificate abbiamo caratterizzato il tipo di modificazione a cui va incontro il recettore Ron, utilizzando due approcci sperimentali diversi. Lo scorso anno abbiamo ottenuto dati preliminari mediante l'utilizzo di un vettore di espressione codificante una forma mutata dell'ubiquitina (Ub-KO) non in grado di formare catene di poliubiquitina. L'assenza del segnale di ubiquitinazione osservata esprimendo il recettore in associazione all'Ub-KO suggeriva che il tipo di modificazione a cui va incontro il recettore prevede l'addizione di catene di ubiquitina (poliubiquitinazione).

Per confermare questo dato abbiamo utilizzato due anticorpi monoclonali in grado di discriminare tra multi- e poliubiquitinazione. Uno è in grado di rilevare sia monomeri che catene di poliubiquitina (P4D1), l'altro non riconosce singole molecole di ubiquitina (FK1).

E' stato valutato il segnale di ubiquitinazione del recettore Ron e, come controllo, dell'EGFR espressi entrambi in modo stabile in cellule NIH-3T3. Mentre nel caso dell'EGFR è stato ottenuto, come atteso, un segnale di ubiquitinazione soltanto con l'anticorpo P4D1, Ron ha mostrato un "pattern" simile con entrambi gli anticorpi, confermando la presenza di catene di poliubiquitina (fig.1).

I risultati ottenuti indicano, pertanto, che il recettore Ron è soggetto a poliubiquitinazione, una modificazione non osservata sugli altri recettori tirosina chinasi finora caratterizzati.

L'MSP induce la degradazione del recettore Ron.

Sulla base di dati di letteratura che indicano il coinvolgimento dell'ubiquitinazione nella regolazione della degradazione abbiamo caratterizzato la degradazione di Ron in risposta all'MSP in cellule NIH-3T3 esprimenti stabilmente il recettore (NIH-Ron).

E' stato valutato il livello del recettore mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro il dominio intracellulare della catena β .

La cinetica di degradazione di Ron è risultata significativamente più lenta di quella osservata per altri RTKs (Chiarugi *et al.*, 2002; Jeffers *et al.*, 1997), con ancora il 30% di recettore presente dopo 8 ore di continua stimolazione (fig.2).

Al contrario, il mutante oncogenico Ron^{M1254T} che, sulla base dei dati ottenuti lo scorso anno, non è in grado di interagire con l'ubiquitina ligasi c-Cbl, non viene significativamente degradato in seguito a stimolazione.

L'inibizione dell'attività del proteasoma, ma non del lisosoma, impedisce la degradazione di Ron e ne sostiene l'attivazione.

Evidenze sperimentali indicano che il lisosoma esercita un ruolo fondamentale nella "down-regulation" dei recettori tirosina chinasi attivati, mentre la poliubiquitinazione è associata alla degradazione proteica mediata dal proteasoma 26S (Haglund *et al.*, 2003a). E' stato pertanto valutato il ruolo di questi sistemi proteolitici nella degradazione indotta da MSP del recettore Ron poliubiquitinato.

Abbiamo inizialmente analizzato la cinetica di degradazione di Ron in cellule NIH-Ron preincubate con lactacistina, un inibitore altamente specifico dell'attività del proteasoma (Fenteany & Schreiber, 1998). In queste condizioni la degradazione recettoriale è stata totalmente abrogata (fig.3a), con livelli di recettore significativamente più alti rispetto al controllo non trattato a tutti i tempi della cinetica presa in esame.

La specificità dell'azione della lactacistina sulla degradazione di Ron è stata dimostrata utilizzando cellule NIH-3T3 esprimenti in modo stabile l'EGFR (NIH-EGFR). Come atteso, l'inibitore non ha determinato variazioni significative alla cinetica di degradazione dell'EGFR (fig.3b). Analoghi risultati sono stati ottenuti su entrambe le linee cellulari con l'inibitore meno selettivo MG132.

Abbiamo inoltre verificato il ruolo della degradazione proteica nella terminazione dell'attività di segnalazione di Ron.

A tale scopo abbiamo valutato lo stato di attivazione di due note vie di segnalazione, la via di PI3K/Akt e la via delle MAPK. La quota di recettore che sfugge alla degradazione resta attiva, come dimostrato dalla persistenza di forme fosforilate delle proteine ERK-1,2 e Akt (fig. 3a).

I dati ottenuti dimostrano che la degradazione del recettore è necessaria per un'efficiente interruzione della sua attività di trasduzione del segnale.

Esperimenti analoghi sono stati condotti in presenza di un inibitore dell'attività del lisosoma, per verificare l'eventuale coinvolgimento di questo compartimento "down-regulation" di Ron. In cellule trattate con concanammina, un inibitore della pompa protonica vacuolare ATP dipendente, è stata osservata solo una debole stabilizzazione recettoriale, statisticamente non significativa e comunque non sufficiente a sostenere l'attivazione delle due vie di segnalazione (fig. 4a). Al contrario la concanammina ha marcatamente limitato la degradazione dell'EGFR (fig.4b), in accordo con dati di letteratura che dimostrano il coinvolgimento del compartimento lisosomiale nella degradazione di questo recettore (Alwan *et al.*, 2003; Waterman & Yarden, 2001). Tali risultati sono stati confermati utilizzando la cloroquina, un inibitore meno specifico dell'attività del lisosoma.

I dati ottenuti indicano che l'attività del proteasoma è necessaria per la degradazione di Ron, mentre il compartimento lisosomiale non è determinante nella proteolisi del recettore intero.

L'inibizione del proteasoma stabilizza il recettore attivato a livello della membrana plasmatica.

Per valutare la localizzazione subcellulare delle molecole recettoriali che si accumulano in condizioni di alterata attività del proteasoma è stata condotto un esperimento di biotinilazione di superficie.

Cellule NIH-Ron o NIH-EGFR sono state o meno trattate con lactacistina o concanamicina e stimolate con l'opportuno fattore di crescita. Dopo una marcatura della superficie cellulare con biotina le cellule sono state lisate ed è stata condotta un'immunoprecipitazione con anticorpi anti-recettore. Dopo 8 ore di stimolazione con MSP è stata ancora evidenziata una frazione di recettore esposta in membrana (fig.5), suggerendo che la lenta cinetica di degradazione possa essere correlata ad un basso ritmo di internalizzazione. Il trattamento con lactacistina ha impedito la diminuzione del livello di recettore esposto in membrana. Come atteso, l'inibitore non ha influenzato la degradazione dell'EGFR. Il trattamento con concanamicina, pur inibendo la degradazione dell'EGFR, non ha tuttavia impedito la sua internalizzazione, come dimostrato dalla scomparsa del recettore biotinilato a 8 ore dalla stimolazione.

Questi dati indicano che l'inibizione del proteasoma sostiene l'attivazione di Ron non solo impedendo la sua degradazione, ma anche stabilizzando il recettore esposto in membrana.

L'internalizzazione del recettore intero non è richiesta per la sua degradazione.

Per verificare se l'aumentata stabilità in membrana del recettore in presenza di lactacistina fosse dovuta ad un'inibizione dell'internalizzazione o piuttosto ad un aumentato riciclo, abbiamo effettuato un saggio di internalizzazione basato sull'utilizzo della tripsina. Questo approccio sperimentale sfrutta l'attività triptica per tagliare il dominio extracellulare del recettore esposto in membrana, consentendo l'identificazione delle molecole internalizzate, la cui migrazione in SDS-PAGE non viene quindi variata (Ceresa *et al.*, 1998).

Esperimenti preliminari in cellule NIH-Ron non trattate e stimolate con MSP, non hanno consentito di rilevare, a nessun punto della cinetica presa in esame, molecole recettoriali protette dall'attività della tripsina, quindi internalizzate (fig.6a

e 6b). Come atteso il livello del precursore intracellulare pr170 è risultato invariato.

L'attendibilità della metodica è stata confermata dai risultati ottenuti da un esperimento analogo sulle stesse cellule, esprimenti PDGFR endogeno, stimulate con PDGF. A partire da 45 minuti dall'aggiunta del fattore di crescita è stato riscontrato un aumento del livello di recettore intero, come descritto in letteratura (Chiarugi *et al.*, 2002).

I risultati ottenuti suggeriscono che l'endocitosi del recettore intero non rappresenta un processo fondamentale per sua degradazione.

La localizzazione intracellulare del recettore in seguito a stimolazione con MSP è stata verificata anche in microscopia confocale. A tale scopo è generata una linea cellulare esprimente in modo stabile il recettore Ron recante un tag HA all'estremità C-terminale, per ovviare alla indisponibilità di anticorpi anti-Ron utilizzabili in immunofluorescenza. Mentre nel caso dell'EGFR si osserva una evidente internalizzazione del recettore in risposta al ligando, in cellule NIH-RonHA la localizzazione recettoriale non risulta alterata dopo stimolazione con MSP (fig. 7). Risultati analoghi sono stati ottenuti con stimolazioni più prolungate.

L'inibizione dell'attività di metallopeptidasi limita la degradazione di Ron.

Il modello di degradazione recettoriale indipendente dall'internalizzazione suggerisce l'esistenza di meccanismi alternativi, che prevedono un taglio proteolitico del recettore a livello della membrana plasmatica ed il successivo indirizzamento della porzione intracellulare alla degradazione nel proteasoma.

Per verificare tale ipotesi è stato valutato l'effetto sulla degradazione recettoriale di un pannello di inibitori di proteasi appartenenti a diverse classi enzimatiche. Come mostrato in figura 8, l'inibitore di metallopeptidasi 1,10-fenantrolina ha determinato una marcata riduzione della degradazione di Ron, suggerendo un coinvolgimento di enzimi appartenenti a questa classe nel processo degradativo del recettore.

PROSPETTIVE FUTURE

Sulla base dei dati ottenuti, il lavoro sperimentale futuro sarà volto ad elucidare il meccanismo di degradazione di Ron mediante esperimenti mirati a chiarire l'effettivo ruolo dell'internalizzazione in questo processo.

Verrà pertanto valutata la degradazione recettoriale indotta da MSP in condizioni di inibita endocitosi. A tale scopo saranno utilizzati approcci diversi:

- inibitori chimici dell'endocitosi (concanavalina, clorpromazina)
- linea cellulare esprimente in modo inducibile un mutante dominante negativo della dinamina (K44A), proteina necessaria per l'endocitosi dipendente da vescicole di clatrina
- silenziamento genico di proteine coinvolte nel processo endocitico (Hrs, catena pesante della clatrina) mediante RNAi

Saranno effettuati studi su linee tumorali in cui è stata riscontrata un'iperespressione di Ron (Chen *et al.*, 2000; Maggiora *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003) per valutare eventuali alterazioni a carico del meccanismo di degradazione del recettore. Saranno inoltre studiati gli effetti di una forzata degradazione recettoriale indotta da iperespressione di c-Cbl

Infine verrà valutato se il silenziamento genico di Ron mediante RNAi determini una regressione del fenotipo tumorale in queste linee cellulari.

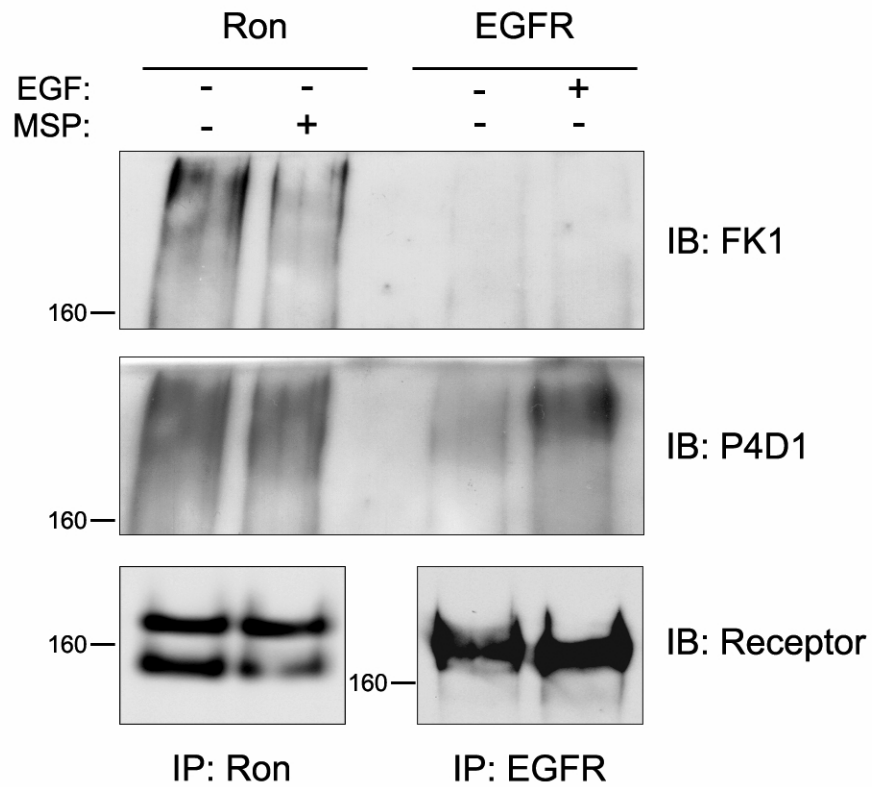


Fig. 1. Dopo stimolazione con MSP (300 ng/ml, 20 min.) o EGF (100 ng/ml, 15 min.) cellule NIH-Ron o NIH-EGFR sono state lisate e gli estratti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-recettore e sottoposti a SDS-PAGE e immunoblotting con anticorpo anti poli-ubiquitina (FK1). Dopo stripping, il filtro è stato decorato con anticorpi anti mono-/poli-ubiquitina (P4D1) e anti recettore.

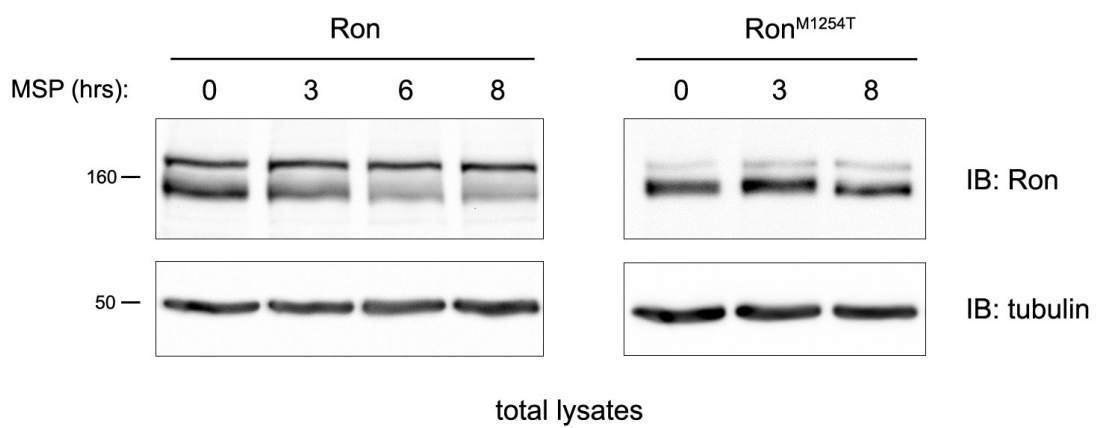
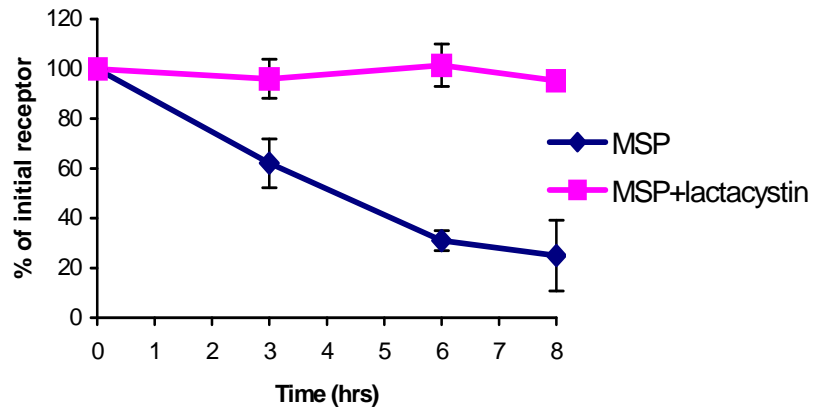
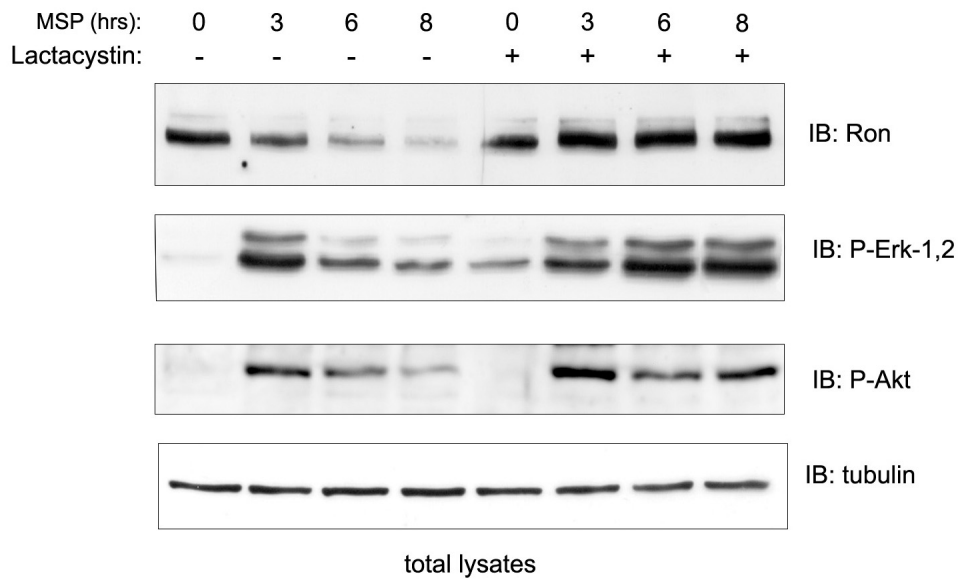


Fig. 2. Cellule NIH-3T3 esprimenti in modo stabile Ron o il mutante Ron^{M1254T} sono state lisate dopo stimolazione con MSP (300 ng/ml) per diversi tempi e gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting con anticorpi diretti contro la porzione C-terminale di Ron e contro la α -tubulina.

a



b

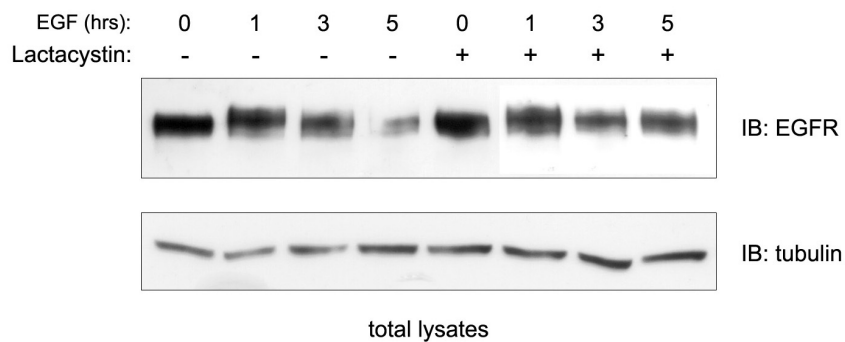


Fig. 3. Cellule NIH-Ron o NIH-EGFR, trattate o meno con lactacistina, sono state lisate dopo stimolazione con MSP o EGF per diversi tempi e gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE. Pannello **a**. Analisi in immunoblotting e rappresentazione grafica dell'analisi densitometrica di tre diversi esperimenti. Pannello **b**. Analisi in immunoblotting di un esperimento rappresentativo di tre.

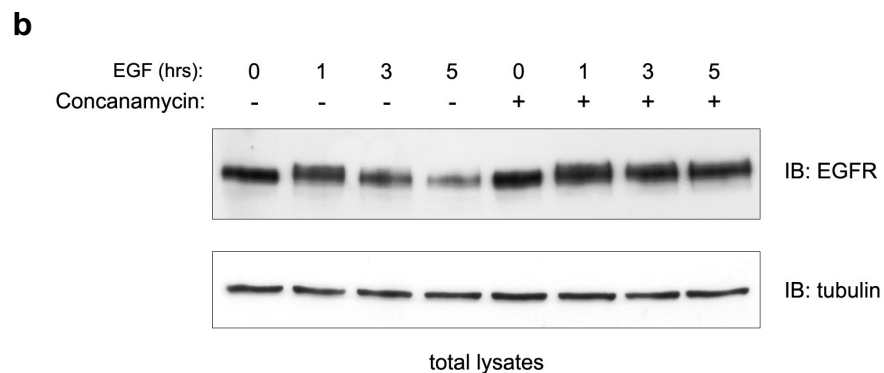
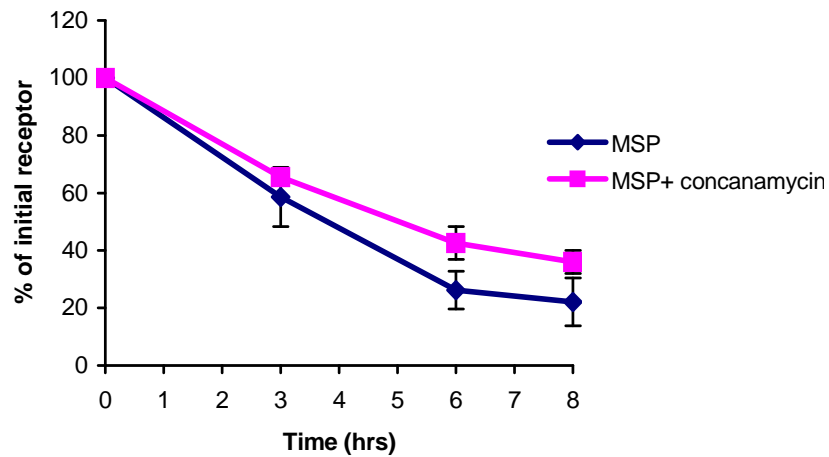
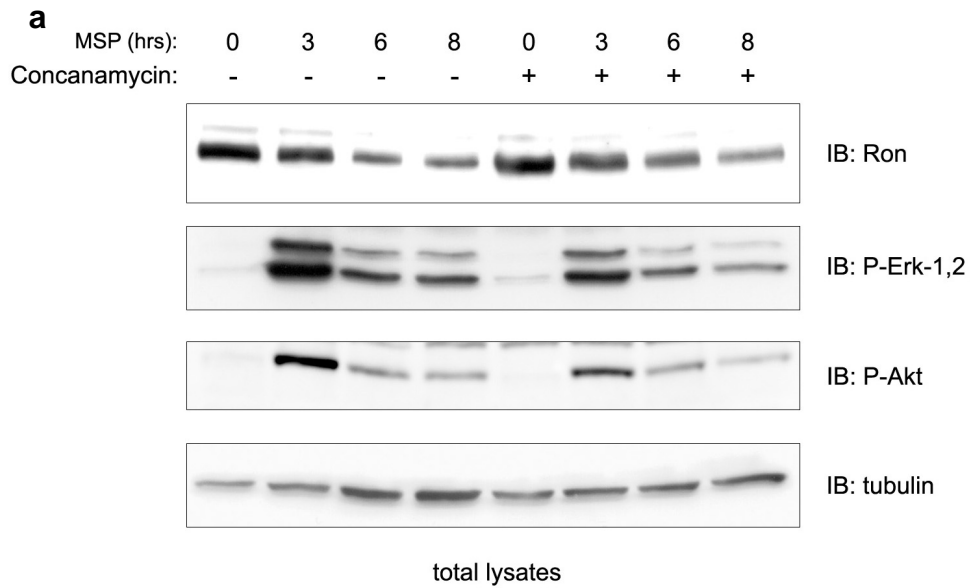


Fig. 4. Cellule NIH-Ron o NIH-EGFR, trattate o meno con concanamicina, sono state lisate dopo stimolazione con MSP o EGF per diversi tempi e gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE. Pannello **a**. Analisi in immunoblotting e rappresentazione grafica dell'analisi densitometrica di tre diversi esperimenti. Pannello **b**. Analisi in immunoblotting di un esperimento rappresentativo di tre.

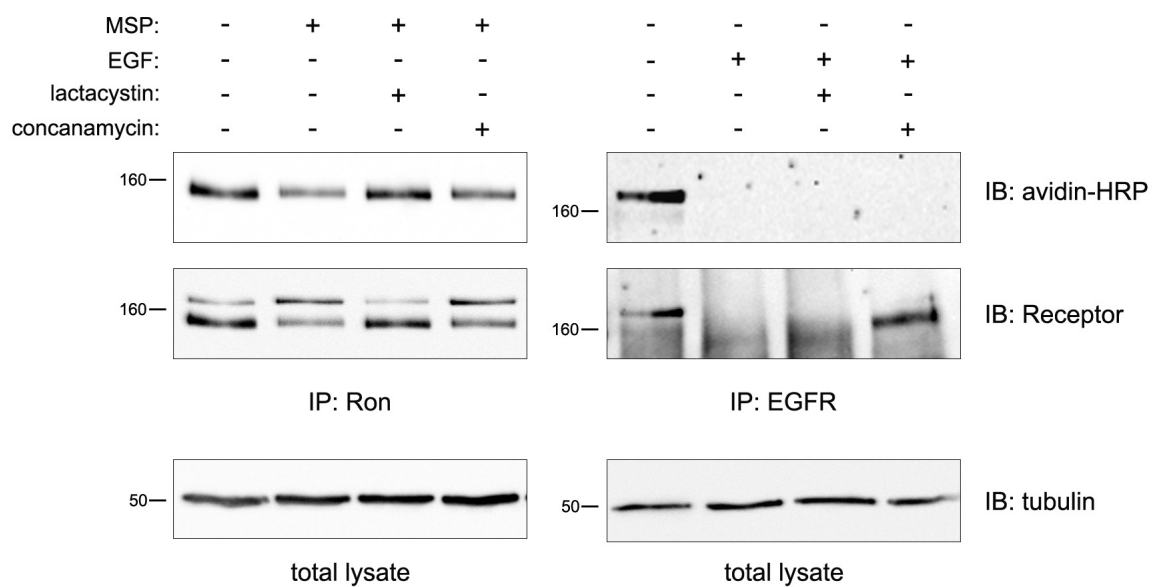


Fig. 5. Cellule NIH-Ron o NIH-EGFR, trattate o meno con concanamicina o lactacistina, sono state stimulate con MSP o EGF per otto ore. Dopo marcatura delle proteine di superficie tramite biotinilazione, gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blotting.

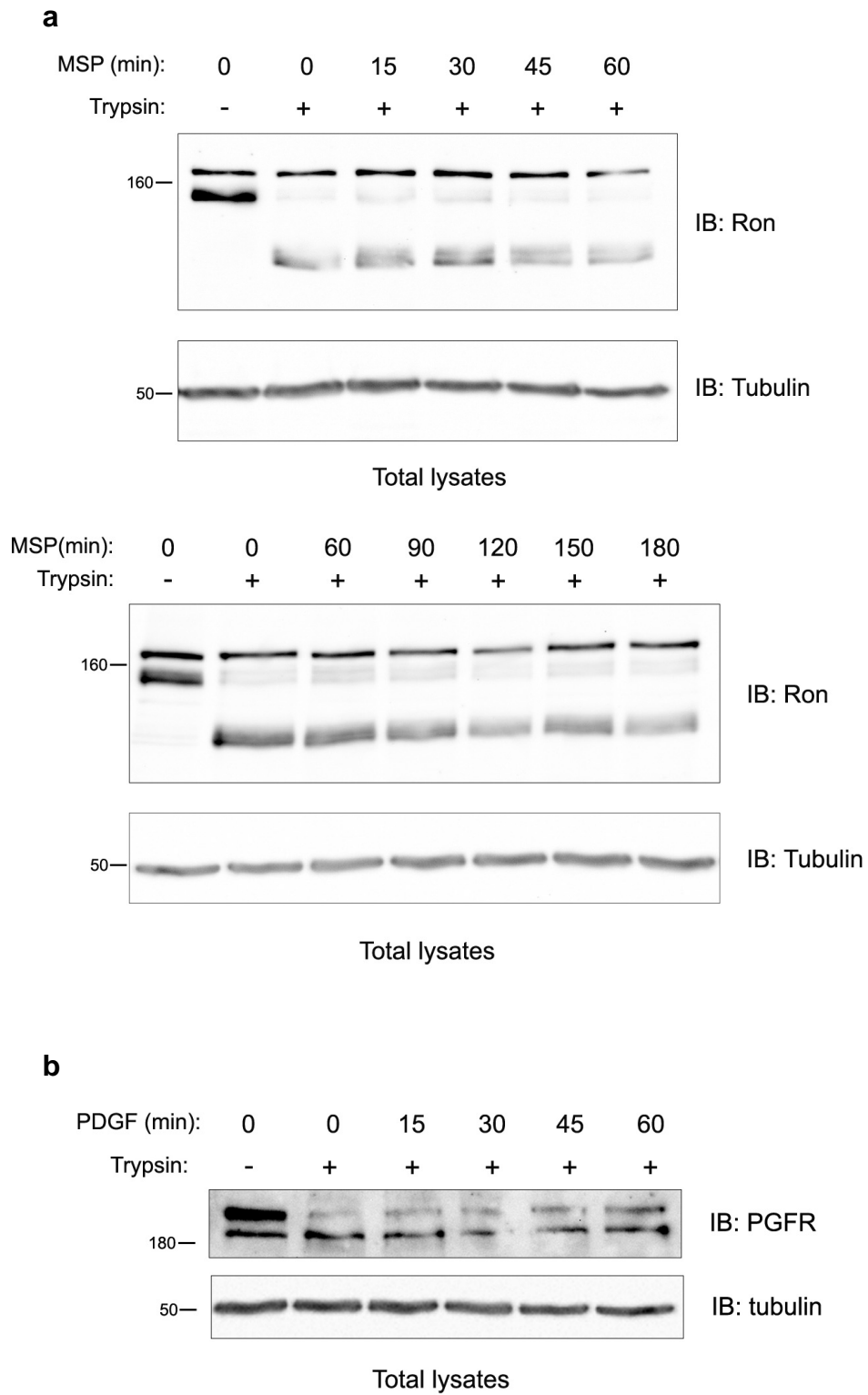


Fig. 6. Cellule NIH-Ron sono state stimulate con MSP o PDGF per diversi tempi. Sono state quindi poste in ghiaccio e sottoposte all'attività della tripsina per 30'. Dopo inattivazione della tripsina, le cellule sono state quindi lisate e gli estratti totali sono stati analizzati in immunoblotting.

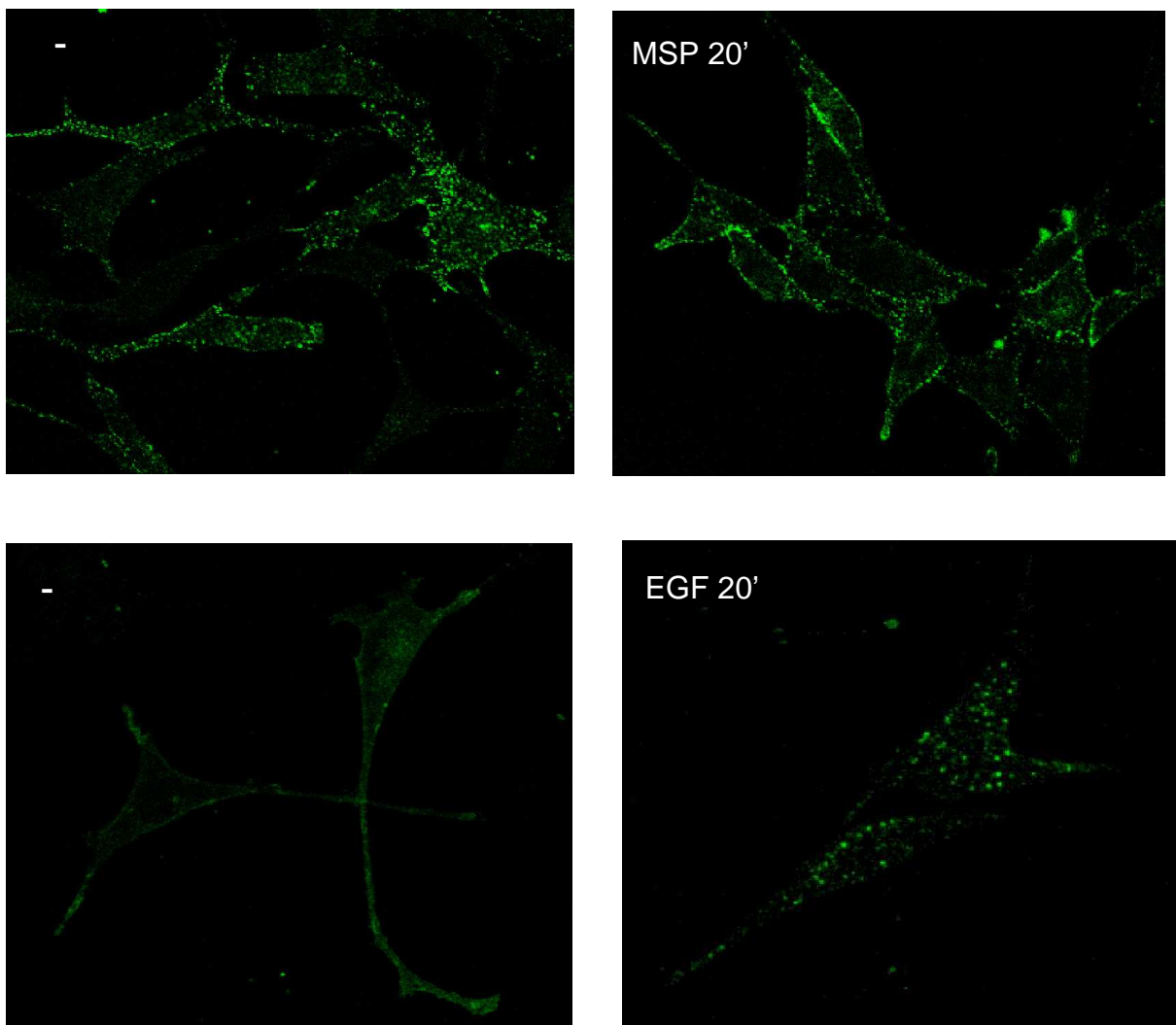


Fig. 7. Cellule NIH-RonHA o NIH-EGFR sono state stimulate con MSP o EGF per 20'. Dopo fissazione e permeabilizzazione sono state incubate con anticorpi anti-HA o anti-EGFR e successivamente con anticorpi secondari coniugati con FITC. I preparati sono stati analizzati in microscopia confocale ed è stata riportata una sezione rappresentativa (obiettivo 40X).

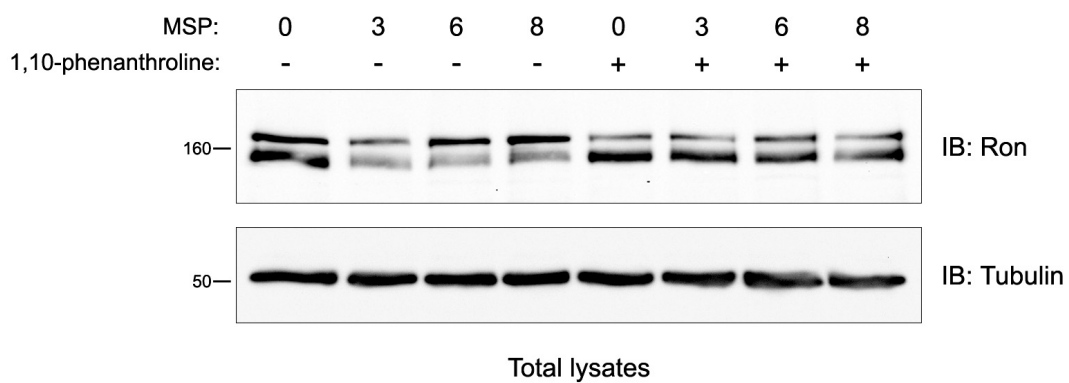


Fig. 8. Cellule NIH-Ron, trattate o meno con 1,10-fenantrolina, sono state lisate dopo stimolazione con MSP per diversi tempi e gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE e analizzati in immunoblotting con anticorpi anti-Ron e anti- α -tubulina.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Alwan, H. A. J., van Zoelen, E. J. J. & van Leeuwen, J. E. M. (2003). Ligand-induced lysosomal Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J Biol Chem* **278**, 35781-35790.

Bache, K. G., Slagsvold, T. & Stenmark, H. (2004). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *Embo J* **23**, 2707-2712.

Ceresa, B. P., Kao, A. W., Santeler, S. R. & Pessin, J. E. (1998). Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* **18**, 3862-3870.

Chen, Y. Q., Zhou, Y. Q., Angeloni, D., Kurtz, A. L., Qiang, X. Z. & Wang, M. H. (2000). Overexpression and activation of the RON receptor tyrosine kinase in a panel of human colorectal carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* **261**, 229-238.

Chiarugi, P., Cirri, P., Taddei, M. L., Talini, D., Doria, L., Fiaschi, T., Buricchi, F., Giannoni, E., Camici, G., Raugei, G. & Ramponi, G. (2002). New perspectives in PDGF receptor downregulation: the main role of phosphotyrosine phosphatases. *J Cell Sci* **115**, 2219-2232.

Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Skeel, A., Nakaigawa, N., Zbar, B. & Leonard, E. J. (2001). Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the beta-catenin pathway. *Mol Cell Biol* **21**, 5857-5868.

Dikic, I. & Giordano, S. (2003). Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 128-135.

Fenteany, G. & Schreiber, S. L. (1998). Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem* **273**, 8545-8548.

Gaudino, G., Follenzi, A., Naldini, L., Collesi, C., Santoro, M., Gallo, K. A., Godowski, P. J. & Comoglio, P. M. (1994). RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *Embo J* **13**, 3524-3532.

Haglund, K., Di Fiore, P. P. & Dikic, I. (2003a). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* **28**, 598-603.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P. & Dikic, I. (2003b). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* **5**, 461-466.

Jeffers, M., Taylor, G. A., Weidner, K. M., Omura, S. & Vande Woude, G. F. (1997). Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* **17**, 799-808.

Lee, P. S., Wang, Y., Dominguez, M. G., Yeung, Y. G., Murphy, M. A., Bowtell, D. D. & Stanley, E. R. (1999). The Cbl protooncogene stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *Embo J* **18**, 3616-3628.

- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B. & Yarden, Y. (1998).** c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* **12**, 3663-3674.
- Li, B. Q., Wang, M. H., Kung, H. F., Ronsin, C., Breathnach, R., Leonard, E. J. & Kamata, T. (1995).** Macrophage-stimulating protein activates Ras by both activation and translocation of SOS nucleotide exchange factor. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 110-118.
- Maggiore, P., Marchio, S., Stella, M. C., Gai, M., Belfiore, A., De Bortoli, M., Di Renzo, M. F., Costantino, A., Sismondi, P. & Comoglio, P. M. (1998).** Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma. *Oncogene* **16**, 2927-2933.
- Miyake, S., Mullane-Robinson, K. P., Lill, N. L., Douillard, P. & Band, H. (1999).** Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain. *J Biol Chem* **274**, 16619-16628.
- Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J. & Yarden, Y. (2003).** Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* **278**, 21323-21326.
- Peschard, P., Fournier, T. M., Lamorte, L., Naujokas, M. A., Band, H., Langdon, W. Y. & Park, M. (2001).** Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* **8**, 995-1004.
- Santoro, M. M., Gaudino, G. & Marchisio, P. C. (2003a).** The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. *Dev Cell* **5**, 257-271.
- Santoro, M. M., Gaudino, G. & Villa-Moruzzi, E. (2003b).** Protein phosphatase 1 binds to phospho-Ser-1394 of the macrophage-stimulating protein receptor. *Biochem J* **376**, 587-594.
- Santoro, M. M., Penengo, L., Minetto, M., Orecchia, S., Cilli, M. & Gaudino, G. (1998).** Point mutations in the tyrosine kinase domain release the oncogenic and metastatic potential of the Ron receptor. *Oncogene* **17**, 741-749.
- Schlessinger, J. (2000).** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Thien, C. B. & Langdon, W. Y. (2001).** Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 294-307.
- Thiery, J. P. (2002).** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442-454.
- Walrafen, P., Verdier, F., Kadri, Z., Chretien, S., Lacombe, C. & Mayeux, P. (2004).** Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* in press.

Wang, M. H., Wang, D. & Chen, Y. Q. (2003). Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis* **24**, 1291-1300.

Wang, M. H., Montero-Julian, F. A., Dauny, I. & Leonard, E. J. (1996). Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase for epithelial cell migration activated by human macrophage stimulating protein. *Oncogene* **13**, 2167-2175.

Waterman, H. & Yarden, Y. (2001). Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett* **490**, 142-152.

ATTIVITA' SCIENTIFICA

- Giornata della Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici –Proteomica, una tecnica per molte applicazioni. Busto Arsizio, 6 febbraio 2004.
- I Convegno Biotecnologi. Torino, 27-29 febbraio 2004
“Insights on negative regulation of the Ron tyrosine kinase receptor (poster).
- Convegno ABCD Traffico di membrana e biogenesi degli organelli.
Certosa di Pontignano (Siena), 7-8 maggio 2004.
- VI Convegno FISV. Riva del Garda, 30 settembre-3 ottobre 2004.
“Negative regulation of the Ron tyrosine kinase receptor”
(poster e presentazione orale).

SEMINARI FREQUENTATI

- 27/01/2004 “Chemistry and biology of natural products-derived molecules targeted to the brain”
(Dott. Alan Kozikowski, University of Illinois, Chicago)
- 03/02/2004 “Alterazioni del gene della perforina nelle patologie lfoproliferative”
(Dott.ssa Rita Clementi, Università di Pavia)
- 17/02/2004 “Citocromo P450: polimorfismi genetici e risposta clinica ai farmaci”
(Dott.ssa Maria Gabriella Scordo, Department of Medical Sciences Clinical Pharmacology University of Uppsala, Svezia)
- 18/02/2004 “Lipid rafts e recettore per l' ossitocina: modulazione del signalling e del controllo della proliferazione cellulare”
(Dott.ssa Bice Chini, CNR Istituto di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia cellulare e molecolare, Milano)
- 10 /03/2004 “TNF, anti-TNF ed autoimmunità”
(Prof. Guido Valesini, Cattedra di Reumatologia, Università la Sapienza di Roma)
- 31/03/2004 “Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali”
(Dott.ssa Antonia Follenzi, Albert Einstein College of Medicine, Liver Research Center 1300 Morris Park Avenue, Bronx, USA)
- 28/04/2004 “Norme operative di protezione e sicurezza per i laboratori di ricerca”
(Dott. Marco Brambilla, Università del Piemonte Orientale, Novara)

- 03/05/2004 "Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes"
(Dott. Frédéric Rieux-Laucat, INSERM 429, Hôpital Necker, Paris)
- 20/05/2004 "Le artriti croniche del bambino"
(Dott. Alberto Martini, Istituto Scientifico Gaslini e Università di Genova)
- 11/06/2004 "Virus e malattie autoimmuni"
Dott. Antonio Puccetti (Università di Genova)
- 14/06/2004 "Pitfalls of genetic studies in liver disease"
(Prof. Christopher Day, Centre for Liver Research, Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK)
- 14/06/2004 "Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems"
(Dott. David Murphy, Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia, Università di Bristol)
- 15/06/2004 "Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity"
(Dott. David Murphy, Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia, Università di Bristol)
- 30/06/2004 "Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica"
(Dott. Manlio Ferrarini, IST e Università di Genova)
- 05/07/2004 "From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions"
(Prof. Armando Bartolazzi, Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina, Ospedale St. Andrea, Università La Sapienza, Roma)
- 07/07/2004 "Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy"
(Prof. Martin Ronis, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, USA)