

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA  
SCIENZE MORFOLOGICHE UMANE E MOLECOLARI

Ciclo XX

**Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: BIO/16**

RUOLO DELLA PLC $\gamma$ 1 E DELLA PKC $\epsilon$  NEL  
DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO

**Presentata da: GIAN CARLO GABOARDI**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Chiar.mo Prof. LUCIO COCCO**

**Chiar.mo Prof. LUCIO COCCO**

**Esame finale anno 2008**

# INDICE

## **INDICE** **2**

---

## **INTRODUZIONE** **4**

---

LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE	5
I POLIFOSFOINOSITIDI	7
LE FOSFOLIPASI C	12
<i>Organizzazione delle diverse isoforme di PLC</i>	12
<i>Struttura e meccanismo di regolazione delle PLC</i>	14
LE FOSFOLIPASI C $\gamma$	18
<i>Attivazione delle PLC<math>\gamma</math> mediata dalle proteine tirosine chinasi</i>	19
<i>Fosforilazione di residui non tirosinici</i>	20
<i>Regolazione mediata da recettori non tirosina chinasi</i>	21
<i>Modulazione dell'attività catalitica</i>	21
LE PROTEINE CHINASI C	24
<i>Classificazione ed organizzazione delle PKC</i>	24
<i>Regolazione delle PKC</i>	25
LA PROTEINA CHINASI $\epsilon$	27
<i>Struttura, regolazione e attivazione della PKC<math>\epsilon</math></i>	28
IL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO IN CELLULE C2C12	30

## **SCOPO DELLA RICERCA** **31**

---

## **MATERIALI E METODI** **33**

---

MATERIALI	34
METODI	35
<i>Colture Cellulari</i>	35
<i>Frazionamento cellulare</i>	35
<i>Preparazione degli omogenati totali</i>	35
<i>Determinazione delle proteine</i>	35
<i>Immunoprecipitazione</i>	36
<i>Pull Down</i>	36
<i>Saggio di attività della PKC<math>\epsilon</math> in vitro</i>	36
<i>Western Blot</i>	37
<i>Immunofluorescenza in situ</i>	37
<i>Trasfezione cellulare</i>	38
<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i>	38

## **RISULTATI** **39**

---

<i>Analisi dell'espressione proteica e dell'attività enzimatica della PKC<math>\epsilon</math> durante il differenziamento miogenico indotto da insulina in cellule C2C12</i>	40
<i>La PKC<math>\epsilon</math> e la PLC<math>\gamma</math>1 interagiscono attraverso i domini SH della PLC<math>\gamma</math>1</i>	41
<i>Il complesso PKC<math>\epsilon</math>-PLC<math>\gamma</math>1 aumenta a livello perinucleare durante il differenziamento miogenico</i>	42
<i>L'espressione della PKC<math>\epsilon</math> influenza l'espressione della ciclina D3 durante il differenziamento miogenico</i>	44

<i>La PKC<math>\epsilon</math> modula l'attivazione del promotore della ciclina D3, in particolare attraverso la regione -37</i>	46
<i>Attivazione dei fattori di trascrizione AP2<math>\alpha</math> e NF-<math>\kappa</math>B in funzione dei livelli proteici della PKC<math>\epsilon</math> e della PLC<math>\gamma</math>1, in cellule C2C12 indotte al differenziamento miogenico</i>	48

---

<b>DISCUSSIONE</b>	<b>50</b>
--------------------	-----------

---

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>
---------------------	-----------

# **INTRODUZIONE**

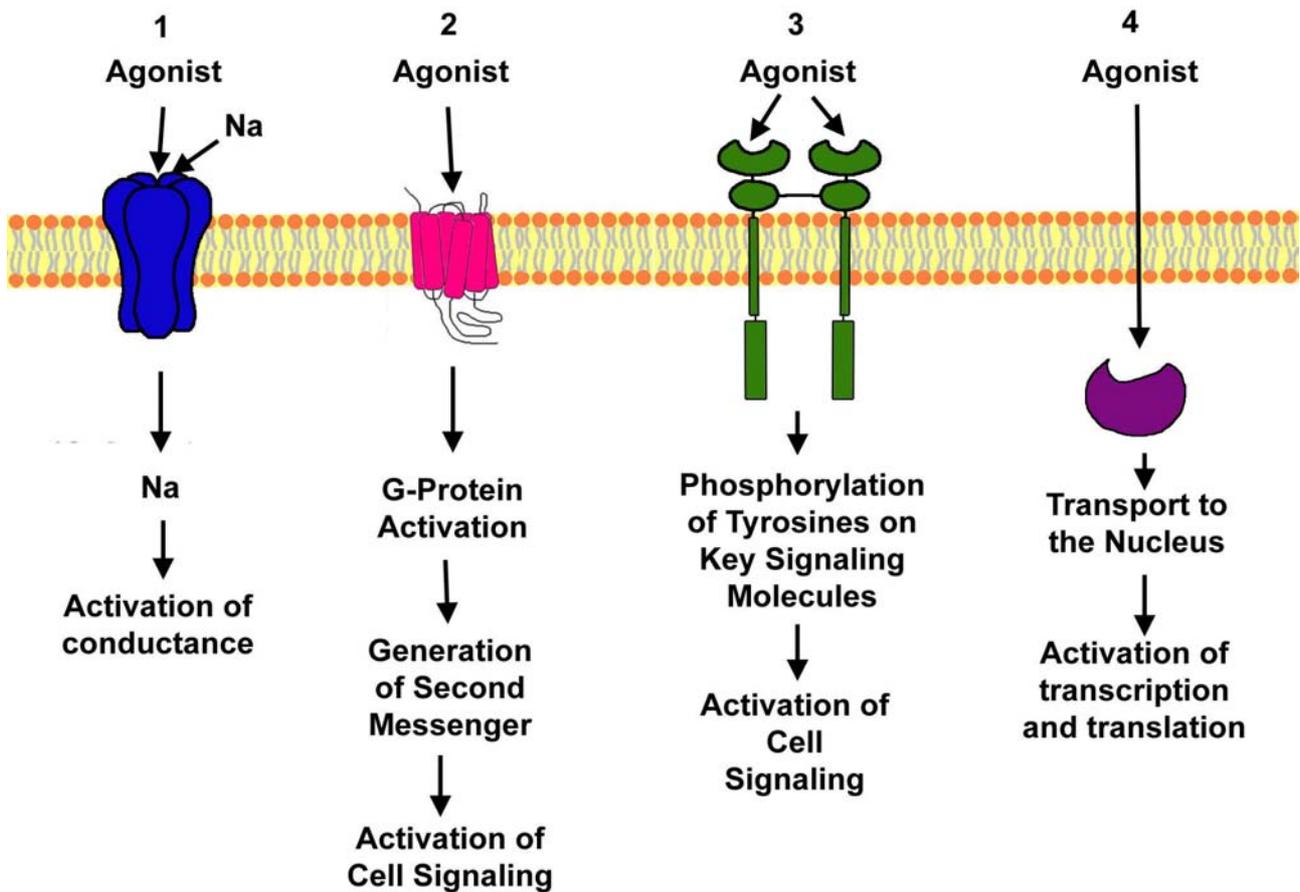
## LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

La capacità di rispondere all'ambiente circostante e di controllare l'ingresso e l'uscita di molecole attraverso la membrana plasmatica sono caratteristiche di qualunque cellula. Nella maggior parte dei casi questi processi dipendono da proteine transmembrana che comprendono canali ionici, trasportatori e recettori in grado di legare specifiche molecole denominate ligandi. L'interazione di un ligando con un recettore scatena, di solito, una o più risposte all'interno della cellula e questi processi prendono il nome di trasduzione del segnale [1]. In questo modo una molteplicità di informazioni può essere trasmessa dall'esterno all'interno originando una risposta cellulare adeguata al segnale recepito. Pertanto il concetto di trasduzione del segnale implica il superamento di una barriera che funge da ostacolo fisico. La trasduzione del segnale fornisce inoltre un mezzo di amplificazione del segnale originario poiché l'attività catalitica generata all'interno della cellula presenta ampiezza molto maggiore rispetto al segnale extracellulare [1]. Molto spesso il segnale extracellulare viene trasdotto da piccole molecole definite secondi messaggeri, come ad esempio l'AMP ciclico [2] e il diacilglicerolo (DAG).

Il processo di trasduzione del segnale, che può portare a risposte di tipo mitogenico, differenziativo, apoptotico, di contrazione, di secrezione, etc, si articola in diverse fasi che seguono un preciso ordine di reazioni estremamente specifiche:

- fase 1-Ricezione del segnale: Il ligando si lega allo specifico recettore di superficie che subisce così una modificazione conformazionale ed interagisce con molecole intracellulari;
- fase 2-Trasduzione del segnale: Si ha l'attivazione di una delle numerose cascate di reazione definite *signaling pathways* che coinvolgono differenti proteine, enzimatiche e non, nucleotidi e lipidi. Queste portano alla modificazione conformazionale di strutture localizzate a diversi livelli: nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e sarcoplasmatico e nel citoscheletro;
- fase 3-Organizzazione della risposta: In seguito all'attivazione del segnale cellulare si possono avere diversi meccanismi di risposta, stimolazione od inibizione della replicazione del DNA o della trascrizione di particolari geni, rilascio di  $Ca^{2+}$  dai depositi intracellulari, apertura di canali ionici, alterazioni conformazionali di proteine citoscheletriche, attivazioni enzimatiche;
- fase 4-Risposta: La cellula reagisce al segnale trasmesso (Figura 1).

Il meccanismo che consente la trasduzione del segnale utilizzando componenti del ciclo dei polifosfoinositidi come secondi messaggeri ha destato sempre più interesse negli ultimi anni. Le cascate attivate da tali fosfolipidi sono in grado di regolare nel nucleo i meccanismi di proliferazione e differenziamento cellulare, in base al segnale ricevuto dall'esterno della cellula.



**Figura 1: Classificazione dei recettori.**

1: recettore a canale ionico. Il ligando, in genere un neurotrasmettitore, induce l'apertura o la chiusura di una proteina transmembrana, definita canale ionico, che permette l'ingresso o l'uscita di ioni. La migrazione di ioni determina una variazione del potenziale elettrico della membrana e quindi della sua permeabilità. La durata del processo è nell'ordine di millisecondi.

2: recettore associato a proteine G. Circa l'80% degli ormoni conosciuti trasducono il segnale in associazione a proteine G, proteine localizzate sul versante citoplasmatico del plasmalemma. Le proteine G vengono così definite per la loro capacità di legare il GDP. Il legame dell'agonista al recettore provoca una variazione conformazionale del recettore stesso che porta all'attivazione della proteina G. Questo meccanismo d'attivazione prevede il rilascio del GDP e la sostituzione con GTP. A questo punto la proteina attivata è in grado di regolare l'attività degli effettori: enzimi (come l'adenilato ciclasi e la fosfolipasi C) che catalizzano la formazione di secondi messaggeri quali ad esempio il cAMP, il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo trisfosfato (IP<sub>3</sub>). La durata del processo è dell'ordine di pochi secondi.

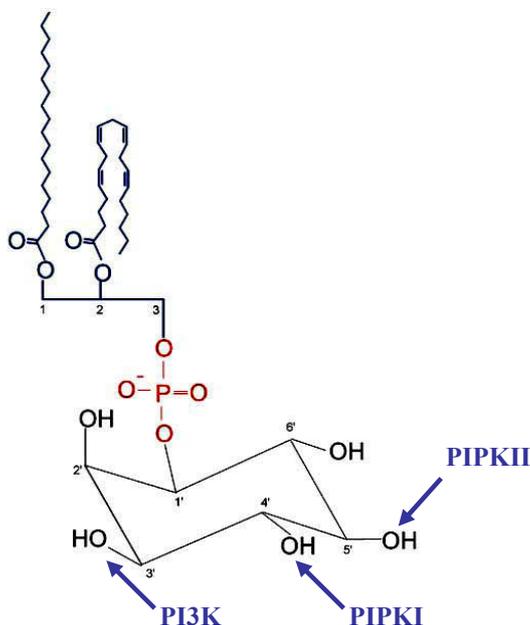
3: recettore che lega enzimi. Sono in genere recettori tirosin chinasi che in seguito all'interazione col ligando sono in grado di fosforilare proteine e determinare una cascata enzimatica (ad esempio MAP chinasi). Questa classe comprende soprattutto fattori di crescita (IGF, EGF, insulina, NGF, PDGF). La durata del processo è di pochi minuti.

4: recettore che lega il DNA. Si tratta generalmente di recettori per ormoni steroidei che sono in grado di attraversare la membrana e legarsi direttamente al recettore localizzato nel nucleo. Il recettore attivato si lega a specifiche sequenze di DNA che permettono la trascrizione di mRNA specifici. La durata del processo è di diverse ore.

Essendo coinvolto nella trasduzione del segnale e regolazione della proliferazione cellulare, lo studio del ciclo dei fosfoinositidi riveste un'importanza che si estende anche al settore della ricerca contro il cancro [3].

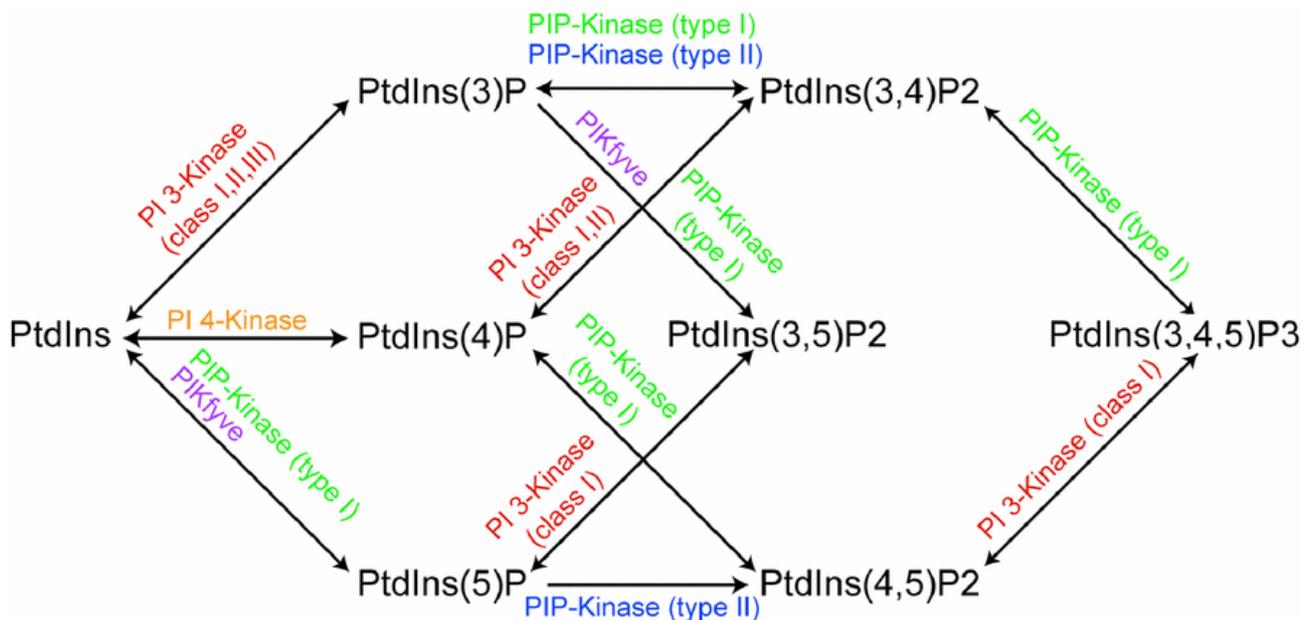
## I POLIFOSFOINOSITIDI

I secondi messaggeri lipidici sono componenti intermedi nella trasmissione degli stimoli extracellulari attraverso l'attivazione di recettori in grado di regolare diverse risposte cellulari [4]. Questi messaggeri vengono sintetizzati attraverso vie di trasduzione del segnale molto complesse. In alcuni tipi cellulari in cui si ha attivazione del ciclo dei fosfoinositidi, il recettore è integrato nella membrana plasmatica ed interagisce con la molecola di *signaling* sul lato extracellulare. Tale interazione produce una variazione conformazionale del recettore, che assume così una forma idonea al legame con altre proteine situate sul versante citoplasmatico della membrana. Si attiva in tal modo la cascata cellulare che ha come fine ultimo la risposta al segnale iniziale. I fosfoinositidi comprendono una famiglia di otto lipidi minori di membrana che giocano ruoli fondamentali in diversi meccanismi di trasduzione del segnale nella cellula [5]. Tali lipidi sono: fosfatidilinositolo (PI) (Figura 2), PI(3)P, PI(4)P comunemente detto PIP, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> definito PIP<sub>2</sub> e PI (3,4,5)P<sub>3</sub> definito PIP<sub>3</sub>.



**Figura 2. Configurazione del fosfatidilinositolo.** Il fosfatidilinositolo può essere fosforilato in una delle tre posizioni: 3OH, 4OH, 5OH da parte di PI3K o PIPK (di tipo I e II), rispettivamente.

Le fosforilazioni possono avvenire in posizione 3, 4, 5 ad opera di differenti fosfoinositide chinasi [6] (Figura 3). I fosfoinositidi fosforilati in posizione 4 e/o 5 sono conosciuti come “fosfoinositidi classici”; quelli fosforilati in posizione 3, invece, sono stati scoperti successivamente.



**Figura 3. Sintesi dei polifosfoinositidi.** Principali vie di sintesi dei fosfoinositidi nelle cellule di mammifero. Alcune di queste vie sono state osservate in vitro, ma non in vivo [3].

Le prime indicazioni sul *signaling* dipendente dai fosfoinositidi risalgono a metà degli anni 50, quando si scoprì che alcune molecole di segnalazione extracellulare erano in grado di stimolare l’incorporazione di fosfato radioattivo nel PI. Tali risultati indicavano che i fosfoinositidi partecipano direttamente alla trasduzione del segnale nella cellula. I lavori successivi si concentrarono quindi sulla caratterizzazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo di tali lipidi quali fosfoinositide chinasi, fosfatasi e fosfolipasi [3, 7].

Il fatto che i fosfoinositidi rappresentassero solo una piccola percentuale (meno del 10%) dei lipidi totali che costituiscono le membrane cellulari, ha subito indicato che, più che funzioni strutturali, essi esercitano specifiche attività regolatrici a livello della trasduzione del segnale.

L’unità strutturale comune a tutti i fosfolipidi dell’inositolo è il fosfatidil-1-D-mio-inositolo (PI), molecola formata dal mio-inositolo unito, mediante un legame fosfodiesterico, ad una molecola di diacilglicerolo (DAG). I due acidi grassi del DAG ( in genere stearico e arachidonico) ancorano la struttura alla membrana plasmatica.

Il PI è prodotto a livello del reticolo endoplasmatico a partire dall’acido fosfatidico (PA) e dal mio-inositolo secondo la via di sintesi de novo composta da due fasi: inizialmente, il PA reagisce col

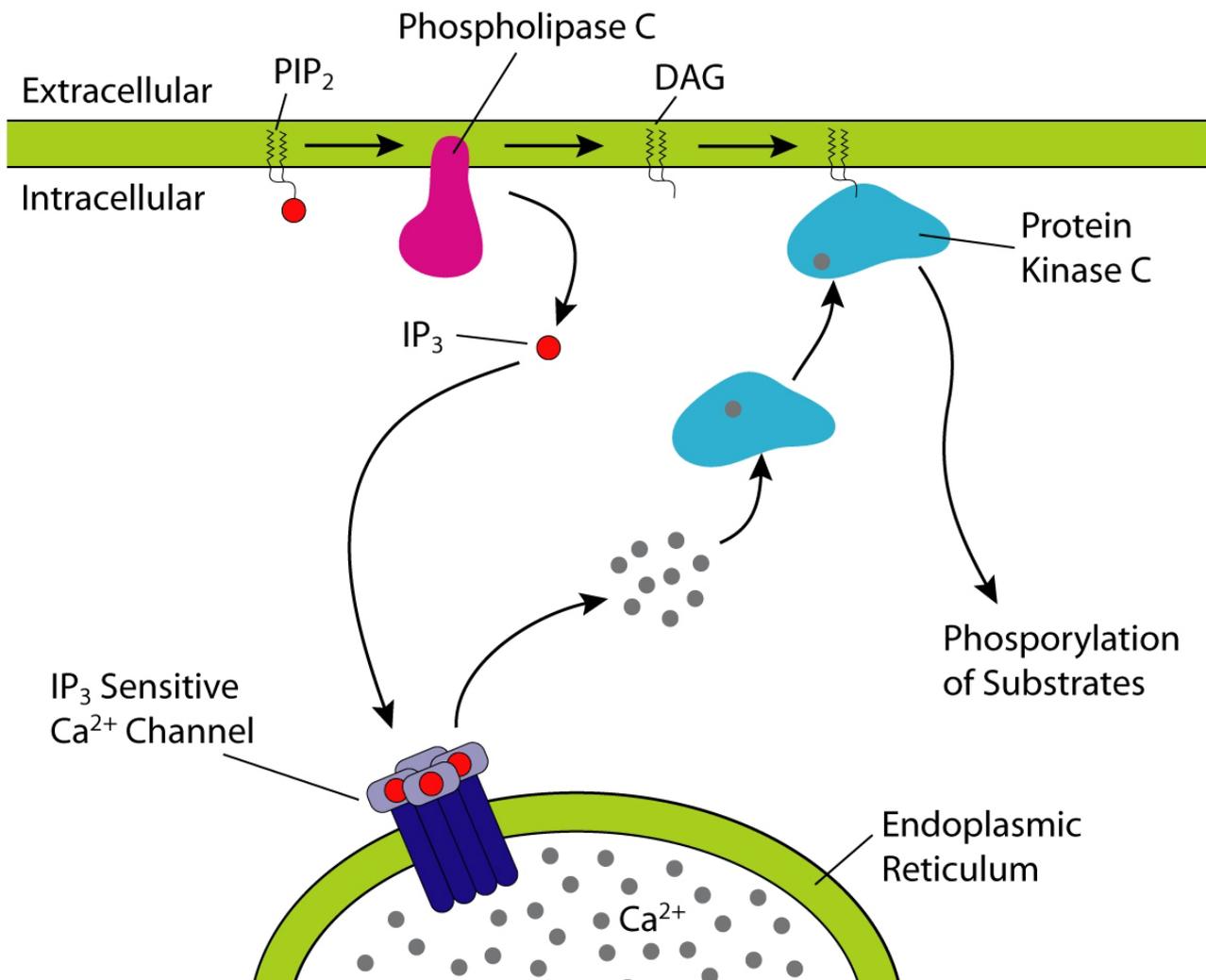
citosintrifosfato (CTP) per formare citosinmonofosfato-PA (CMP-PA) e pirofosfato. Poi il CMP-PA reagisce col mio-inositolo producendo PI e CMP. Il PA deriva, a sua volta, dal DAG a cui viene ceduto il  $\gamma$ -fosfato dell'ATP [4].

Diverse fosfoinositide chinasi possono agire a livello delle posizioni 3, 4 e 5 del PI generando gli altri sette componenti della famiglia. A differenza di altre famiglie di protein chinasi, quelle specifiche per i fosfoinositidi presentano omologie di sequenza solo a livello del dominio catalitico, suggerendo che il meccanismo di trasferimento dei gruppi fosfato sia comune. Proteine omologhe alle fosfoinositide chinasi degli animali sono state identificate anche nelle piante a dimostrazione del fatto che la funzione di *signaling* sia ubiquitaria e conservata nel corso dell'evoluzione [4, 5].

Tra i prodotti delle fosfoinositide chinasi, il PIP<sub>2</sub> è sicuramente una molecola chiave poiché precursore di 3 importanti secondi messaggeri: l'inositolo 1,4,5-P<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>) che modifica i livelli di Ca<sup>2+</sup> intracellulare, il DAG e il PIP<sub>3</sub> che è in grado di attivare la proteina chinasi B, conosciuta anche come Akt [7, 8]. La proteina Akt ha attività anti-apoptotica andando a fosforilare specifici substrati. Presenta un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) ad alta affinità per il PIP<sub>3</sub>.

L'enzima responsabile della genesi di DAG e dell'IP<sub>3</sub> è una fosfolipasi C fosfoinositide-dipendente definita PI-PLC o più brevemente PLC [3] che è presente a tutti i livelli della scala biologica. a oggi, nei mammiferi sono stati identificati diversi isozimi divisi in cinque classi (- $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\zeta$ , - $\eta$ ) [9]. L'idrolisi del PIP<sub>2</sub> catalizzata dalla PLC è uno degli eventi iniziali nella regolazione di numerose funzioni cellulari da parte di più di un centinaio di molecole di *signaling* extracellulare. Questa reazione produce il DAG e l'IP<sub>3</sub>.

La reazione di idrolisi catalizzata dalle PLC avviene attraverso due fasi sequenziali: innanzitutto si ha il taglio del fosfoinositide in DAG e IP<sub>2</sub> ciclico, poi si ha la conversione di quest'ultimo in IP<sub>3</sub> [5, 10]. Mentre il DAG rimane associato alla membrana plasmatica, l'IP<sub>3</sub> è una piccola molecola polare che viene rilasciata nel citoplasma dove agisce segnalando il rilascio di Ca<sup>2+</sup> dai depositi intracellulari [3] (Figura 4). L'attività delle PLC dipende dalla presenza di Ca<sup>2+</sup> e di substrati specifici quali PIP<sub>2</sub>, PIP, PI. La diminuzione della quantità di PIP<sub>2</sub> a livello della membrana plasmatica rappresenta un importante segnale poiché molte proteine vengono regolate da questo fosfolipide. Il PIP<sub>2</sub>, infatti, è un cofattore per la fosfolipasi D specifica per la fosfatidilcolina ed è un substrato per la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), entrambi enzimi effettori attivati da recettori [3, 10]. La PI3K fosforila la posizione 3 dell'inositolo. Inoltre, il PIP<sub>2</sub> modula la polimerizzazione dell'actina interagendo con varie proteine *actin-binding* e serve come sito di legame alla membrana per molte proteine di segnalazione contenenti domini PH [11]. E' da rilevare che i fosfoinositidi fosforilati in posizione 3 non sono substrato di nessuna PLC, ma agiscono direttamente da messaggeri secondari.



**Figura 4. Ciclo dei polifosfoinositidi.** L'idrolisi del PIP<sub>2</sub> catalizzata dalla PLC genera due distinti messaggeri secondari: il DAG e l'IP<sub>3</sub>.

Per quel che riguarda il DAG, prodotto generato dall'idrolisi ad opera della PLC, è un secondo messaggero lipidico fondamentale che può essere generato anche da altri lipidi come ad esempio la fosfatidilcolina [12, 13]. Il DAG è prevalentemente conosciuto per l'attività di modulatore di isoforme di protein chinasi C (PKC), in grado a loro volta di attivare specifiche cascate del segnale cellulare [14]. Tuttavia sono stati individuati numerosi altri bersagli del DAG come le  $\alpha$ -,  $\beta$ -chimerine, il fattore di scambio del nucleotide guaninico vav, e fattori di scambio del guanil-nucleotide per Ras e Rap [14]. Esistono numerose isoforme di PKC alcune delle quali sono DAG-dipendenti, mentre altre non subiscono un meccanismo di regolazione ad opera del DAG. Gli isozimi della PKC DAG-dipendenti includono le PKC convenzionali  $\alpha$ -,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$  che utilizzano come cofattori per la loro attività il Ca<sup>2+</sup> e il DAG, le PKC nuove  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\eta$ -,  $\theta$ -,  $\mu$  insensibili al Ca<sup>2+</sup>, ma sensibili al DAG. Al contrario le isoforme atipiche PKC- $\zeta$ -,  $\iota$ -,  $\lambda$  non richiedono Ca<sup>2+</sup> e non rispondono all'attivazione da parte del DAG, ma utilizzano altri cofattori. Le PKC DAG-dipendenti

legano questo secondo messaggero attraverso due domini tipo *zinc-finger* presenti nella regione C1. Le isoforme atipiche invece mancano di uno dei due domini *zinc-finger* e non sono pertanto attivabili dal DAG [14].

Il DAG può svolgere diverse funzioni: scindersi per produrre acido arachidonico, precursore delle prostaglandine, oppure legare la PKC per aumentarne l'affinità al  $\text{Ca}^{2+}$ . La PKC così attivata fosforila proteine cellulari procedendo nella via di trasduzione del segnale [14].

Il DAG può essere metabolizzato attraverso tre differenti vie: la prima è rappresentata dall'idrolisi di una catena di acido grasso da parte di una diacilglicerolo lipasi che genera monoacilglicerolo ed acido grasso libero, la seconda dall'aggiunta di CDP-colina o -etanolamina per produrre fosfatidil-colina o -etanolamina, la terza dalla fosforilazione del gruppo idrossilico libero per produrre PA. Nella maggior parte dei casi, la fosforilazione del DAG a PA è la via principale del metabolismo del DAG e tale reazione è catalizzata dalle DGK.

Il controllo dei livelli basali intracellulari del DAG è un aspetto cruciale nella fisiologia cellulare. Il segnale attivato dal DAG deve avere emivita breve altrimenti elevati livelli di DAG indurrebbero trasformazioni maligne. L'attività trasformante del DAG è stata spesso attribuita alla persistente attivazione delle isoforme PKC che sono connesse alla cancerogenesi, come numerose prove sperimentali hanno dimostrato [14]. La PKC è in grado di legare promotori tumorali, quali esteri del forbolo, che possono sostituire il DAG nell'attivazione dell'enzima e provocare una risposta prolungata che va ad interferire con la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare.

La disponibilità di un'ampia gamma di mezzi per la ricerca sui fosfoinositidi, ha permesso, negli ultimi anni, importanti scoperte sull'argomento.

L' $\text{IP}_3$  media il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dai depositi intracellulari legando i recettori che provocano l'apertura di canali specifici. La via dell' $\text{IP}_3$  viene inattivata rapidamente attraverso due possibili meccanismi: l'espulsione di  $\text{Ca}^{2+}$  all'esterno della cellula per mezzo di pompe oppure la defosforilazione mediata da una fosfatasi specifica seguita da successive fosforilazioni con produzione di  $\text{IP}_4$ , messaggero per risposte più lente e prolungate [3].

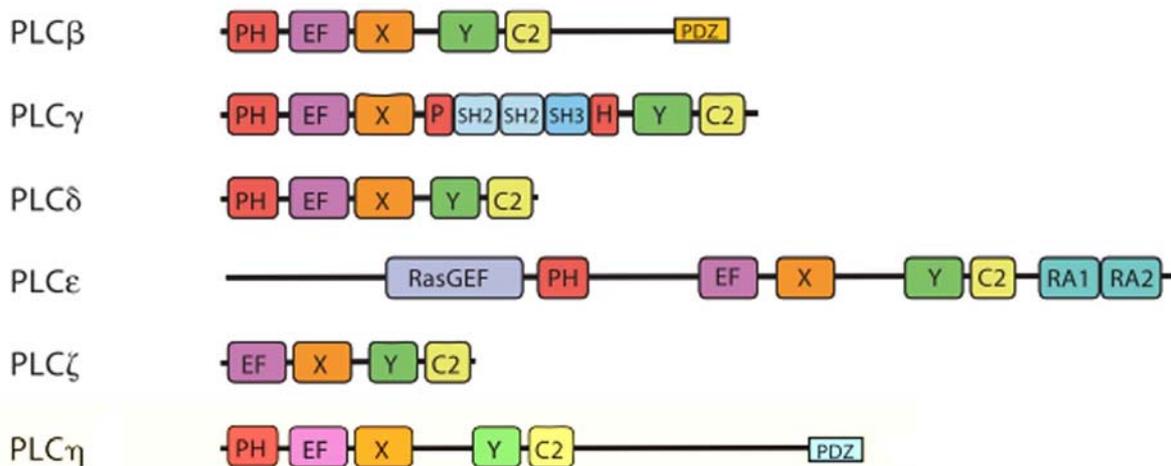
Nel controllo e nella regolazione del ciclo dei fosfoinositidi sono anche molto importanti specifiche fosfatasi, come ad esempio PTEN (*phosphate and tensin homologue*) che agisce sul  $\text{PIP}_3$  convertendolo in  $\text{PIP}_2$  oppure come SHIP1 e SHIP2 (*SH2-domain containing inositol phosphatases*) in grado di defosforilare specifici fosfoinositidi, andando così a spegnere il segnale generato.

Oltre al convenzionale ciclo dei polifosfoinositidi, sono state individuate ulteriori vie metaboliche in grado di generare o regolare i fosfoinositidi [10].

## LE FOSFOLIPASI C

### Organizzazione delle diverse isoforme di PLC

Nella famiglia delle fosfolipasi C (PLC) fanno parte proteine presenti in molti organismi, comprendenti batteri, piante e animali. In base alla sequenza ed alla modalità di attivazione, la famiglia delle PLC è suddivisa in sei gruppi principali: il gruppo delle PLC $\beta$ , che comprende a sua volta le isoforme - $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, - $\beta$ 4; quello delle PLC $\gamma$ , che è composto dalle isoforme - $\gamma$ 1 e - $\gamma$ 2; quello delle PLC $\delta$ , composto dagli isoenzimi - $\delta$ 1, - $\delta$ 2, - $\delta$ 3 e - $\delta$ 4; il gruppo delle PLC $\eta$ , composto dalle isoforme - $\eta$ 1 e - $\eta$ 2; la PLC $\zeta$  e la PLC $\epsilon$  sono attualmente uniche (figura 5).



**Figura 5. Organizzazione dei domini presenti nelle isoforme delle PLC [15].**

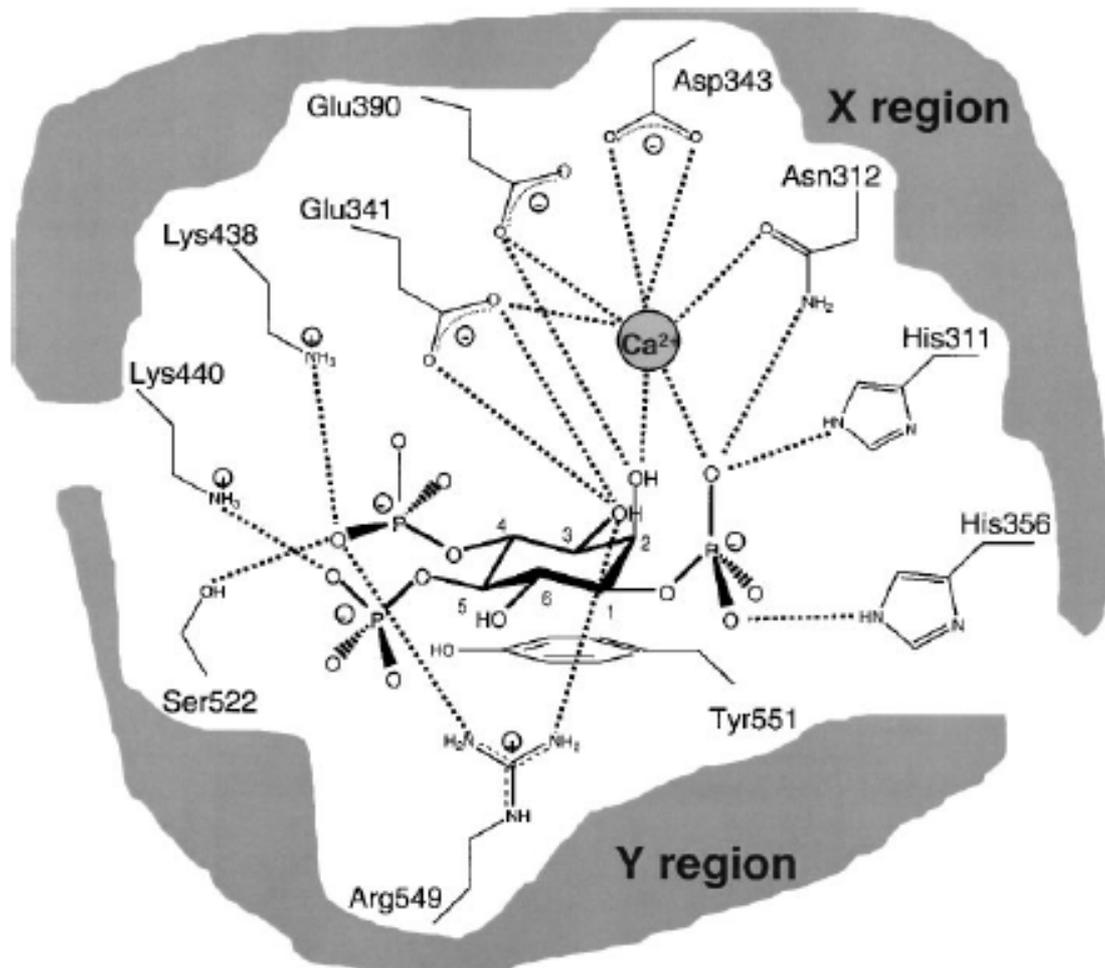
Anche se le varie isoforme hanno strutture molecolari alquanto differenti, possiedono la caratteristica comune di essere strettamente dipendenti dal  $\text{Ca}^{2+}$  e di mediare l'idrolisi specifica di fosfolipidi contenenti inositolo. Gli isozimi della PLC $\delta$  hanno un peso molecolare di circa 85 kilodalton (kDa); quelli delle famiglie - $\beta$ , - $\gamma$  e la - $\eta$  hanno un peso compreso fra 120-155 kDa; la PLC $\epsilon$  di circa 230-260 kDa, mentre 70 kDa per la  $\zeta$ . Gli eucarioti inferiori, come lieviti e muffe, contengono solamente gli enzimi appartenenti alla famiglia - $\delta$ ; nelle piante invece, è stata trovata solo una PLC priva del dominio Pleckstrin Homology (PH), simile alla PLC $\zeta$ , la quale sembra essere l'enzima da cui deriverebbero tutte le altre diverse isoforme [16]. All'interno della struttura delle PLC sono presenti vari domini regolatori come il domino PH, il dominio C2, il dominio EF-hand [17] che si possono trovare anche in altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale cellulare. Sebbene la struttura generale di questi domini è ben conservata, la loro specificità di legame può variare. Per esempio, il dominio PH oltre a legare differenti tipi di fosfoinositidi, può

dare origine ad interazioni di tipo proteina-proteina, come nel caso della PLC $\beta$ 2, in cui il complesso tra il dominio PH e la proteina Rac1 è stato ben caratterizzato [18]. Le sequenze aminoacidiche delle diverse PLC più conservate tra loro, sono note come domini X e Y, che costituiscono il *core* catalitico [19, 20]. A questo livello l'omologia tra le sequenze aminoacidiche è circa del 60% tra tutte le 14 isoforme di PLC e può raggiungere livelli maggiori tra gli enzimi appartenenti alla stessa famiglia. La sequenza compresa tra i domini X e Y, detta regione Z, si presenta molto poco conservata tra le PLC dei vari gruppi. Nei gruppi - $\zeta$ , - $\beta$  e - $\delta$  la regione Z varia tra 40-90 residui aminoacidici; inoltre, la PLC $\zeta$  si contraddistingue per la presenza di un'elevata quantità di residui carichi. Nei gruppi delle PLC - $\epsilon$  e - $\eta$  invece, la regione Z si presenta molto più lunga, circa 190 aminoacidi. Nelle isoforme appartenenti alla famiglia - $\gamma$ , la regione Z risulta essere ancora più ampia delle precedenti, 400 residui circa, e presenta due domini SH2 (Src Homology 2) ed uno SH3, che permettono rispettivamente il legame con sequenze contenenti residui tirosinici fosforilati e sequenze ricche di residui prolinici. Tutte le isoforme di PLC, ad esclusione della PLC $\zeta$ , presentano un dominio PH; questo dominio si trova nella porzione ammino-terminale (N-terminale) della proteina, ad eccezione della PLC $\epsilon$  in cui il dominio PH rimane interno alla proteina, mentre la PLC $\gamma$  ne possiede due: uno N-terminale, e uno centrale che a sua volta è separato dai domini SH. Il dominio PH è un modulo costituito da un centinaio di aminoacidi che è stato localizzato in numerosissime proteine di segnale e che permette l'interazione con i polifosfoinositidi [21, 22]. La struttura tridimensionale della PLC $\delta$ 1 [23] ha permesso di rivelare la presenza di altri due moduli: un dominio EF localizzato fra i domini PH e X, e un dominio C2, che qualche volta è considerato come una estensione del dominio Y stesso. I moduli EF e C2 sono presenti in tutti i gruppi di PLC. Inoltre, i vari gruppi della famiglia delle PLC presentano domini che caratterizzano il gruppo di appartenenza, attribuendo alla proteina specifiche proprietà di attivazione, nonché di regolazione. Delle PLC $\delta$ , a parte la loro forte dipendenza dallo ione calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), poco è conosciuto sul loro meccanismo di regolazione. I gruppi delle PLC $\beta$  e delle PLC $\eta$ , invece, sono caratterizzati da un'estremità carbossi-terminale (C-terminale) a valle del dominio Y, più lunga della PLC $\delta$ . In particolare, nel gruppo delle PLC $\beta$  è contenuta una lunga sequenza di circa 400 residui aminoacidici, ad eccezione dell'isozima - $\beta$ 4. Questa regione contiene sia un dominio PDZ, il quale ha la caratteristica di mediare la trasduzione del segnale attraverso la formazione di complessi con altre proteine [24-26], sia un dominio importante per l'associazione della proteina alla membrana, per la localizzazione nucleare, per interagire ed essere attivata dalle proteine  $\text{G}\alpha_q$ , le quali possiedono intrinseca attività GTPasica, e di agire su di esse come attivatori della attività GTPasica (GAP) [27-30]. Il gruppo delle PLC $\eta$  è caratterizzato da un'estremità C-terminale ricca di

residui prolinici e serinici, che potrebbero avere un ruolo nell'interazione proteina-proteina. Inoltre, è presente un dominio PDZ, diverso da quello delle PLC $\beta$  [15]. La PLC $\epsilon$  differisce da tutte le altre forme di PLC in quanto possiede un dominio N-terminale del tutto particolare, simile al *Ras Guanine Nucleotide Exchange Factor* (RasGEF) e due domini RA, che legano il Ras [31-33]. Per quanto riguarda il gruppo delle PLC $\gamma$ , un ruolo importante nella loro attivazione enzimatica è esercitato dalla regione Z, la quale presenta domini di interazione proteina-proteina, come i domini SH2 ed SH3; tali domini hanno la capacità di modulare l'interazione con vari partner proteici e di conseguenza la funzionalità della proteina stessa. Infine, la PLC $\zeta$  ha un importante ruolo fisiologico nella maturazione embrionale [16]. Diverse isoforme di PLC sono caratterizzate anche da prodotti originati mediante splicing alternativo del mRNA. Ad esempio i trascritti primari dei geni delle PLC $\beta$ 1 e  $\beta$ 4 presentano splicing nella regione corrispondente alla porzione C-terminale, a valle del dominio C2 [34, 35]. Sono stati anche identificati tre varianti di splicing della PLC $\delta$ 4; uno di questi splicing presenta una differenza del modulo X tale da codificare per una proteina che risulta essere cataliticamente inattiva [36]. Anche le isoforme appartenenti al gruppo delle PLC  $-\eta$  e  $-\gamma$  presentano prodotti derivati da splicing alternativo [8, 15].

### **Struttura e meccanismo di regolazione delle PLC**

L'analisi della struttura tridimensionale della PLC $\beta$ 2 senza il dominio C-terminale, quella della PLC $\delta$ 1 senza il dominio PH [23] e quella del solo suo dominio PH [37], hanno rivelato l'organizzazione generale delle PLC, la quale risulta così formata da quattro principali domini: un dominio PH, un dominio EF, un dominio catalitico (X e Y) e un dominio C2 [38]. Il sito catalitico è costituito dai domini X e Y, di cui oramai si conoscono i residui implicati nel legame con il gruppo dell'inositolo, i quali sono conservati tra i vari gruppi delle PLC (Figura 6). La sua struttura a TIM barrel è costituita da 8 filamenti  $\beta$  paralleli disposti a formare una struttura a botte con  $\alpha$  eliche ad un lato. Per quanto riguarda la regione Z, interposta tra il dominio X e Y, e il suo ruolo nella struttura proteica delle fosfolipasi, alcuni esperimenti avevano fatto notare come tale regione è molto suscettibile all'idrolisi, suggerendo che potesse trattarsi di una regione molto flessibile [39]. In seguito alla struttura tridimensionale della PLC $\beta$ 2, una parte della regione Z è stata caratterizzata; in particolare sembra che impedisca l'accesso al PIP $_2$  alla tasca catalitica, con conseguente riduzione della sua idrolisi [18]. In linea con questa osservazione è stato dimostrato che la rimozione della regione Z ha condotto a una maggior attività basale della PLC $\beta$ 2 [2, 40]. Inoltre, un peptide corrispondente alla regione amminoacidica 448-464 all'interno del dominio X,



**Figura 6. Rappresentazione schematica del dominio catalitico della PLC $\delta$ 1 di ratto.** Sono indicati i residui aminoacidici che contattano lo ione  $\text{Ca}^{2+}$  e i gruppi fosfato dell'Ins(1,4,5)P $_3$  [8].

che contiene i residui amminoacidici per legare l'IP $_3$ , attiva la PLC $\beta$ 2. La struttura della PLC $\beta$ 2 ha messo in evidenza che la regione Z è parzialmente in contatto con questa sequenza amminoacidica, mascherandone così il sito catalitico [18]. Il dominio PH della PLC $\delta$ 1 lega sia Ins(1,4,5)P $_3$ , sia al PtdIns(4,5)P $_2$ . In questo modello il legame con il proprio substrato lipidico e, conseguentemente, la sua attività enzimatica dipendono dalla concentrazione di PtdIns(4,5)P $_2$  e l'attività catalitica di questo isozima è inibita da PtdIns(1,4,5)P $_3$ . E' stato inoltre proposto [23] che il dominio PH della PLC $\delta$ 1 legni l'enzima alla membrana plasmatica, attraverso il legame specifico al PtdIns(4,5)P $_2$ , permettendo così all'enzima di catalizzare l'idrolisi di vari substrati, senza dissociarsi dalla membrana lipidica. Sebbene anche le PLC $\beta$  e le PLC $\gamma$  posseggono un dominio PH nel sito N-terminale, gli aminoacidi basici localizzati dentro la tasca di legame con gli inositidi fosfato non risultano conservati. Coerentemente con questa differenza il dominio PH degli isozimi della famiglia PLC $\gamma$  legano il PtdIns(3,4,5)P $_3$  invece del PtdIns(4,5)P $_2$  [41]. I domini PH degli isozimi

della famiglia della PLC $\beta$  legano i doppi strati di fosfolipidi; tuttavia, l'affinità di legame non è influenzata dalla presenza o assenza del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, suggerendo così che questo lipide non richiami la PLC $\beta$  alla membrana plasmatica [42]. Recentemente è stato dimostrato che il dominio PH della PLC $\beta$ 1 lega in maniera specifica il PtdIns(3)P<sub>3</sub>, e questa interazione sembra essere responsabile per il richiamo dell'enzima verso la membrana plasmatica nelle cellule in cui la fosfatidilinositolo3-chinasi (PI3-K) è attivata [41]. Inoltre, l'analisi della struttura tridimensionale del dominio PH della PLC $\beta$ 2 con la proteina Rac1, ha mostrato come questo dominio possa essere coinvolto anche in interazioni di tipo proteina-proteina; inoltre, l'interazione con Rac1 sembra attivare in maniera specifica la PLC $\beta$ 2, rispetto alle altre isoforme - $\beta$  [18, 43]. Si può concludere che i domini PH delle diverse isoforme di PLC possono sia interagire con i diversi tipi di polifosfoinositidi, sia mediare l'interazione con altre proteine.

Un cofattore molto importante nella regolazione dell'attività catalitica di tutte le 14 isoforme di PLC, è lo ione Ca<sup>2+</sup>. Il gruppo della famiglia - $\eta$  risulta essere il più sensibile alla presenza di tale ione [15], mentre la PLC $\delta$  è inattiva a concentrazioni basali. I domini presenti nelle PLC che hanno la capacità di legare lo ione Ca<sup>2+</sup>, sono sia il dominio C2, sia i domini EF. I domini C2 delle PLC sono costituiti da circa 120 residui aminoacidici e sono presenti in moltissime proteine che interagiscono con i lipidi di membrana. Molti domini C2, ma non tutti, legano lo ione Ca<sup>2+</sup> e regolano le interazioni Ca<sup>2+</sup>-dipendenti di certe proteine con i fosfolipidi. Ad esempio, il Ca<sup>2+</sup> si lega al modulo C2 della PLC $\delta$ 1 aumentandone l'attività enzimatica mediante la formazione di un complesso terziario formato da Ca<sup>2+</sup>-enzima-fosfatidilserina che rende l'enzima stesso più affine al proprio substrato [44, 45]. Diversa è invece la regolazione nella famiglia delle PLC $\beta$ , in quanto è stato rivelato che il dominio C2 non mostra particolare affinità per il doppio strato lipidico, anche in presenza di Ca<sup>2+</sup>, ma piuttosto per la subunità  $\alpha$  delle proteine eterotrimeriche Gq [46]. Un ruolo determinante per l'associazione alla membrana viene esercitato invece dal dominio C-terminale delle PLC $\beta$ ; in seguito alla caratterizzazione tridimensionale del dominio C-terminale della PLC $\beta$ 2 di tacchino, è stato mostrato come questo dominio sia composto da tre lunghe eliche superavvolte, che dimerizzano lungo il proprio asse con orientazione antiparallela. Inoltre, questa regione contenente un'alta densità di residui carichi è elettrostaticamente polarizzata; questo ha aiutato ulteriormente a delucidare il legame alle membrane da parte delle PLC $\beta$  [29, 47, 48].

Infine bisogna ricordare che il ruolo preciso del motivo EF delle PLC non è stato ancora totalmente chiarito. Queste sequenze aiutano l'interazione con gli ioni Ca<sup>2+</sup>, anche se in alcune proteine ciò non avviene. Recenti studi mediante cristallografia hanno chiarito l'importanza del dominio EF nel

processo di attivazione della PLC $\delta$ 1; infatti la presenza del gruppo EF che lega il Ca<sup>2+</sup> è necessaria per la corretta interazione con il dominio PH del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> [49].

## LE FOSFOLIPASI $C\gamma$

Come già detto in precedenza, il gruppo delle PLC $\gamma$  si contraddistingue dagli altri gruppi di PLC, per la presenza all'interno della sua struttura di una regione Z molto lunga. In particolare, questa regione contiene due domini SH2 e un dominio SH3 che rispettivamente interagiscono con residui di tirosina fosforilati e sequenze ricche di residui prolinici. Questi domini hanno un'importante influenza sull'attività enzimatica delle PLC $\gamma$ . Inoltre, la regione Z si interpone tra un secondo dominio PH (Figura 7).



**Figura 7. Organizzazione strutturale delle PLC $\gamma$ .** Oltre ai vari domini sono indicati anche i vari siti di legame dei cofattori PIP<sub>3</sub> e Ca<sup>2+</sup>. Con # sono indicati i residui tirosinici fosforilati conosciuti. La PLC $\gamma$ 2, essendo più corta, manca della fosforilazione del residuo tirosinico presente in C2 [10].

Nei mammiferi sono state identificate due tipi di PLC $\gamma$ : la  $\gamma$ 1, espressa ubiquitariamente [50, 51], e la  $\gamma$ 2 che nonostante mostri un'ampia distribuzione tissutale, è maggiormente espressa nelle cellule di origine emopoietica [52]. Nel cervello di ratto adulto, invece, l'espressione e la distribuzione delle due isoforme di PLC $\gamma$  si presenta diversa: la  $\gamma$ 1 risulta molto più diffusa [53, 54] della  $\gamma$ 2, la quale viene espressa solo in alcune regioni [55]. Nei geni che codificano per la PLC  $\gamma$ 1 e la  $\gamma$ 2, sono stati trovati distinti elementi *cis* regolatori [56]. Queste sequenze, presenti sul promotore, sono siti di legame per fattori di trascrizione la cui attività è stata vista coincidere con l'incremento di espressione durante il differenziamento di mioblasti in miotubi [57] e in carcinoma di colon [56, 58]. Inoltre, sono stati notati in diversi sistemi cellulari variazioni di distribuzione subcellulare delle isoforme di PLC $\gamma$ , in particolar modo la traslocazione nucleare; per esempio, durante il differenziamento mieloide di HL60 i livelli di espressione proteica di entrambe le isoforme di PLC $\gamma$ , aumentano e persistono nel compartimento nucleare durante tutto il differenziamento [59]. Queste osservazioni suggeriscono che la traslocazione nucleare della PLC $\gamma$ 1 e della PLC $\gamma$ 2 sono limitate a specifici eventi di stimolazione o differenziamento cellulare. Diversamente dalle isoforme di PLC $\beta$ , le regioni della PLC $\gamma$  richieste per la localizzazione nucleare non sono ancora state identificate.

### **Attivazione delle PLC $\gamma$ mediata dalle proteine tirosine chinasi**

L'attivazione delle PLC $\gamma$  può essere mediata da diversi agenti e attraverso il coinvolgimento di differenti complessi proteici. Una delle vie di attivazione più conosciute della PLC $\gamma$  è quella mediata dai recettori con attività intrinseca di tipo tirosina chinasi (RTK) (Figura 8). Recettori di vari fattori di crescita come il *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *nerve growth factor* (NGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), possiedono un'attività intrinseca di tipo tirosina chinasi; in seguito a stimolo, possono legarsi alle isoforme delle PLC $\gamma$  e successivamente fosforilarle, inducendo l'idrolisi del PIP<sub>2</sub> in diversi sistemi cellulari [60]. Generalmente questi recettori dimerizzano in seguito al legame col ligando, scatenando una transfosforilazione autocatalizzata. In seguito, questi recettori autofosforilati su residui tirosinici reclutano varie proteine effettrici contenenti domini di tipo SH2, come la PI3K e le isoforme della PLC $\gamma$ . Il legame a questi residui autofosforilati può essere indipendente, mutuamente esclusivo o rinforzante tra le varie proteine che possiedono il dominio SH2 [61, 62]. Tali domini, infatti, riconoscendo ed avendo un'alta affinità per i residui fosfotirosinici, possono mediare il legame con i RTK. La selettività di questo legame non è solo determinata dal contorno dei residui tirosinici fosforilati, ma anche dalla struttura del dominio SH2 dell'effettore. Per esempio, nei recettori del PDGF, sono stati trovati diversi siti di autofosforilazione che mediano specifici legami con diversi tipi di proteine quali le Src tirosine chinasi (tirosina 579 e 581), la subunità 85 della PI3K (tirosina 740 e 751), la SH2 proteina tirosina chinasi 2 (SHPTP2) (Tyr1009) e la PLC $\gamma$ 1 (Tyr1021) [63]. Inoltre, la tirosina 766 del recettore FGF e la tirosina 785 del recettore NGF legano in modo specifico la PLC $\gamma$ 1 [64, 65]. In altri casi, invece, il legame può essere meno specifico, per esempio il recettore EGF nella sua regione carbossi-terminale, contiene cinque siti di autofosforilazione i quali non sono necessariamente specifici per l'associazione con i vari domini SH2 delle proteine; la PLC $\gamma$ 1 è infatti capace di legarsi a ciascun residuo, in maniera indistinta [66, 67]. La capacità di interazione di ciascun dominio SH2 della PLC $\gamma$ 1 è stata studiata attraverso l'inattivazione funzionale dei vari domini, seguita dalla successiva espressione delle proteine mutanti in linee cellulare mancanti di PLC $\gamma$ 1 [68, 69]. La proteina mutata e inattivata nel suo dominio SH2 carbossi-terminale (C-SH2), mantiene la capacità di legarsi, di essere fosforilata ed attivata dal recettore PDGF; invece, il mutante inattivato nel suo dominio SH2 ammino-terminale (N-SH2) perde la sua capacità di legarsi e di conseguenza non viene né fosforilato né attivato. Questi risultati suggeriscono che il dominio N-SH2 della PLC $\gamma$ 1 è richiesto per la sua attivazione enzimatica mediata dal PDGF. La fosforilazione della PLC $\gamma$ 1 da parte dei recettori PDGF, EGF, FGF e NGF, avviene sempre nei stessi siti: tirosine 771, 783 e 1254

[70]. I siti tirosinici 771 e 783 sono conservati anche nella sequenza della isoforma  $\gamma 2$  [70, 71], mentre quello tirosinico 1254 è assente. Il ruolo della fosforilazione dei residui tirosinici è stato studiato attraverso la mutagenesi dei vari residui, sostituendoli con la fenilalanina [72]. La sostituzione della tirosina 783 impedisce l'attivazione della PLC $\gamma 1$  da parte del PDGF, ma non la sua associazione al recettore del PDGF. Inoltre, sebbene la mutazione di specifici siti autofosforilativi in vari RTK previene l'associazione con la PLC $\gamma 1$  e quindi la conseguente produzione di IP $_3$ , il recettore mutato ancora mantiene la capacità di mediare la fosforilazione di residui tirosinici della PLC $\gamma 1$  [62, 73-77]. Perciò l'attivazione della PLC $\gamma 1$  mediata dai fattori di crescita richiede non solo la fosforilazione dei residui tirosinici, ma anche l'associazione dell'enzima al recettore del fattore di crescita. Tale associazione è probabilmente richiesta per indirizzare la PLC $\gamma 1$  fosforilata in membrana, dove è presente il suo substrato.

È importante notare anche il ruolo che possono avere le proteine tirosine fosfatasi (PTPasi) nella via di trasduzione del segnale delle RTK e quindi anche delle PLC $\gamma$ . Numerose PTPasi sono state scoperte possedere domini transmembrana, altre invece avere caratteristiche di proteine solubili. Sembra infatti che queste fosfatasi vengano reclutate nei complessi dei recettori attivati dove poi possono defosforilare le molecole effettrici, come la PLC $\gamma$ . Tra i vari modulatori delle PTPasi troviamo le specie reattive dell'ossigeno che in particolare sopprimono la loro attività fosfataseica [78]. Avranno così un importante ruolo nella modulazione dell'attività enzimatica delle PLC $\gamma$  [79]. In seguito al reclutamento delle proteine effettrici da parte dei RTK, segue la fase in cui gli effettori vengono attivati e rilasciati in modo che possano così interagire con i successivi bersagli della trasduzione del segnale. Alcuni di questi successivi segnali includono la produzione di PIP $_3$ , la formazione di IP $_3$ , incremento di Ca $^{2+}$  citoplasmatico, attivazione di altre chinasi che condurranno alla modulazione genica.

### **Fosforilazione di residui non tirosinici**

In risposta a stimoli mediati da fattori di crescita, la PLC $\gamma 1$  può essere fosforilata anche su residui aminoacidici quali serina e treonina [80, 81]. Un sito ben caratterizzato è quello della serina 1248, che può essere fosforilata sia dalla proteina chinasi A (PKA), sia dalla PKC. In vitro, questa fosforilazione non ha effetti sulla attività catalitica. In cellule della linea linfoide Jurkat T, l'attivazione del recettore delle cellule T (TCR) porta ad un aumento della fosforilazione al residuo serina 1248 [82]. Se però l'attivazione del TCR viene preceduta da un'incubazione con sostanze che attivano le PKC o le PKA, la fosforilazione della PLC $\gamma 1$  su residui tirosinici mediata dal complesso antigene-TCR attivato, risulta inibita. Questo suggerisce un importante effetto di regolazione

negativa che il residuo serina 1248 esercita sull'attività catalitica della PLC $\gamma$ 1. Comunque la sola fosforilazione sul residuo 1248 non è sufficiente alla modulazione negativa delle PLC $\gamma$ . Potrebbe invece essere probabile che la fosforilazione di residui aminoacidici, come serina e treonina, portino alla desensibilizzazione di vari effettori delle vie di trasduzione, come le PLC $\gamma$ . A supporto di questa ipotesi è stato mostrato che la mancata attivazione del complesso della PLC $\gamma$ 1 con il recettore dell'EGF, dovuta all'azione degli esteri del forbolo, avviene in seguito a desensibilizzazione del recettore, piuttosto che ad un blocco dell'attività della PLC [83, 84]. L'attivazione delle PKC non porta sempre a una desensibilizzazione del recettore. Per esempio, l'attivazione delle PLC $\gamma$  mediata dal recettore PDGF è favorita dall'attivazione delle PKC [85]. Queste osservazioni mostrano che la modulazione dei complessi proteici può essere mediata da serina/treonina chinasi.

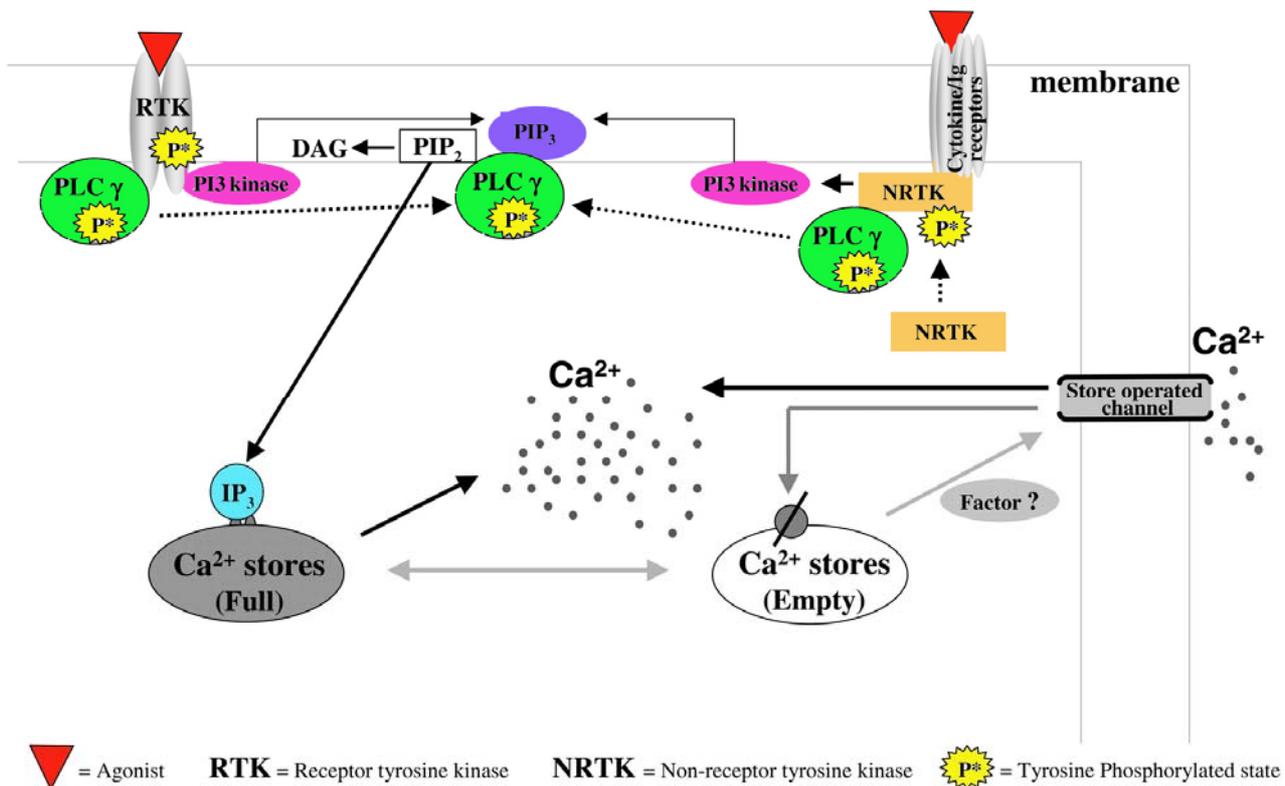
### **Regolazione mediata da recettori non tirosina chinasi**

Le cellule del sistema immunitario possono esprimere recettori che regolano la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi. Questi includono i complessi dei recettori delle cellule B e T i quali hanno la capacità di interagire con la regione Fc delle immunoglobuline (Ig) IgE, IgG, IgA e IgM e con le citochine come l'interleuchina (IL) IL1, IL4, IL5 e IL7. I recettori delle citochine sono espressi anche da altre cellule, oltre che da quelle del sistema immunitario. Diversamente dai RTK, questi recettori sono formati da complessi di catene polipeptidiche che mancano di intrinseca attività tirosina chinasi, ma oligomerizzano per formare una unità recettoriale funzionale. L'attivazione di questi recettori scatena il reclutamento di tirosine chinasi non recettoriali (NRTK) (Figura 8), che includono membri delle famiglie di Src, Jak/Tyr e Syk/Zap70. Queste tirosina chinasi, allo stesso modo delle RTK, reclutano altri effettori che contengono domini SH2, incluso le PLC $\gamma$  le quali vengono fosforilate negli stessi siti tirosinici bersaglio delle RTK [86, 87]

### **Modulazione dell'attività catalitica**

Nonostante le fosforilazioni delle PLC $\gamma$  conducano ad una maggiore attività catalitica, quando le proteine vengono isolate nella loro forma fosforilata e non, presentano attività catalitica simile. Questa osservazione ha condotto alla conclusione che ci devono essere dei modulatori negativi dell'attività catalitica che preferenzialmente legano la forma non fosforilata [88]. In alternativa, l'attivazione della forma fosforilata può richiedere il legame di specifiche proteine o lipidi che nei saggi di attività in vitro mancano. I modulatori negativi più conosciuti sono proteine che si legano

all'actina, molte delle quali legano anche i polifosfoinositidi. In vitro, proteine che legano l'actina come la profilina, sopprimono maggiormente l'attività della forma non fosforilata rispetto a quella fosforilata [89, 90]. E' generalmente osservato che proteine che collegano l'actina del citoscheletro alla superficie della membrana, come la vinculina [91] e la  $\alpha$ -actinina [92], legano il PIP<sub>2</sub>, modulando in maniera negativa l'attività delle PLC. Comunque, ci sono casi in cui l'attività della PLC viene ad essere favorita da proteine che legano sia actina sia il PIP<sub>2</sub>, come nel caso della proteina CapG che aumenta la sensibilità della PLC in seguito a stimolo con PDGF, senza influenzare la sua attività basale [93]. Resta comunque da chiarire come queste proteine possano modulare l'attività delle PLC. Modulatore positivi dell'attività della PLC $\gamma$ 1 sono i polifosfoinositidi, i quali possono essere sia substrati dell'enzima stesso come il PIP<sub>2</sub>, sia non substrati come il PIP<sub>3</sub>. La fosforilazione sui residui tirosinici è stata vista migliorare l'affinità con il PIP<sub>2</sub> [94]. Il modello del meccanismo d'azione implicherebbe così il legame del PIP<sub>2</sub> con un sito non catalitico che conduce il sito catalitico ad incrementare il numero di substrati da idrolizzare. Questo modello sarebbe così in accordo con l'osservazione che le proteine che legano l'actina agirebbero come modulatori negativi nei confronti delle PLC, sottraendo il substrato PIP<sub>2</sub> al sito catalitico delle PLC. Per quanto riguarda la regolazione da parte di lipidi non substrati per la PLC $\gamma$ , il PIP<sub>3</sub> è stato mostrato essere un modulatore positivo e altamente specifico (Figura 8). Questo lipide si lega direttamente al dominio PH carbossi e ammino terminale [95, 96] della PLC $\gamma$ 1, conducendo l'enzima alla superficie della membrana, aumentando la sua capacità di idrolisi nei confronti del PIP<sub>2</sub> anche in assenza di fosforilazioni su residui tirosinici. In accordo con questa affermazione, l'utilizzo di inibitori della PI3K e di mutanti della PI3K che possiedono solo la subunità regolatoria, inibiscono la formazione di IP<sub>3</sub> in seguito a stimolazione con PDGF [96, 97]; la fosforilazione dei residui tirosinici non viene modificata.



**Figura 8. Regolazione delle PLC $\gamma$  tramite RTK, PIP3 e NRTK.** Recettori per i fattori di crescita, antigeni e citochine richiamano e attivano le PLC $\gamma$  e la PI3K. Fosforilazioni su residui tirosinici presenti nelle PLC $\gamma$ , catalizzati dall'attività chinasi intrinseca del recettore stesso o da chinasi reclutate in seguito a stimolo, conducono ad attivazione dell'attività fosfolipasica. Inoltre il prodotto della PI3K, ovvero il PIP3, permette alle PLC $\gamma$  di essere ancorate alla membrana una volta dissociate dalle proteine tirosine chinasi [10].

## LE PROTEINE CHINASI C

La PKC è una proteina chinasi multifunzionale, indipendente dai nucleotidi ciclici, che fosforila residui di serina e treonina di molte proteine bersaglio. Questo enzima è stato identificato nel cervelletto di bovino come proteina che fosforila istoni e protamine [98, 99]. Il suo ruolo nella traduzione del segnale l'ha vista coinvolta in processi di memoria [100], differenziamento [101], proliferazione [102] e carcinogenesi [103]. A oggi la PKC comprende una larga famiglia di enzimi che differiscono nella struttura, nel tipo di cofattore richiesto per l'attività e per la sua funzione. La famiglia delle PKC è la più larga famiglia di serina/treonina chinasi conosciuta alla quale sono state accreditate molte risposte biologiche [104]. La sua molteplicità, assieme alla sua variazione cellulare e distribuzione tissutale e abbondanza, potrebbero spiegare come a questa chinasi sono state attribuite così svariate e numerose funzioni cellulari.

### Classificazione ed organizzazione delle PKC

Alla famiglia delle PKC appartengono dieci isoforme, strutturalmente simili tra loro; può essere divisa in tre gruppi che differiscono nel cofattore richiesto per la propria attività catalitica. Questi tre gruppi di PKC sono conosciuti come classiche (cPKC), di cui fanno parte la  $-\alpha$ ,  $-\beta 1$ ,  $-\beta 2$  e la  $-\gamma$  le quali richiedono  $Ca^{2+}$  e DAG per essere attivate; le nuove (nPKC), ovvero le isoforme  $-\delta$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\eta$  (anche conosciuta come PKC-L)  $-\theta$  e  $-\mu$  (isoforma del topo omologa alla isoforma umana conosciuta anche come PKD) le quali richiedono solo DAG per la loro attivazione; infine ci sono le atipiche (aPKC), di cui fanno parte la  $-\zeta$ ,  $-\iota$  e la  $-\lambda$  (isoforma del topo omologa della isoforma umana  $\iota$ ), che non richiedono  $Ca^{2+}$  e DAG per essere attivate. Un nuovo membro delle PKC è stato recentemente scoperto a cui è stato attribuito il nome di PKCv. Questa nuova proteina, contenente 890 aminoacidi, è molto simile alla isoforma PKC $\mu$ /PKD, e perciò con esse potrebbe costituire un quarto gruppo di PKC. Tutte le PKC possiedono un sito di legame per la fosfatidilserina. La struttura generale delle PKC consiste di un dominio catalitico e di uno regolatorio, rispettivamente nella regione carbossi e ammino-terminale. Entrambi i domini sono composti di un numero di regioni conservate (C1-C4), intervallate con regioni a più bassa omologia, chiamate domini variabili (V0-V5) (Figura 9). La regione C1 è presente in tutti gli isoenzimi e comprende domini tipo *zinc finger* ricchi di cisteine. Il legame con il DAG è assicurato dalla presenza di due domini di questo tipo, denominati A e B. Le cPKC e le nPKC presentano i due domini tipo zinc finger mentre le aPKC ne possiedono soltanto uno; pertanto non possono essere attivate dal DAG [14].

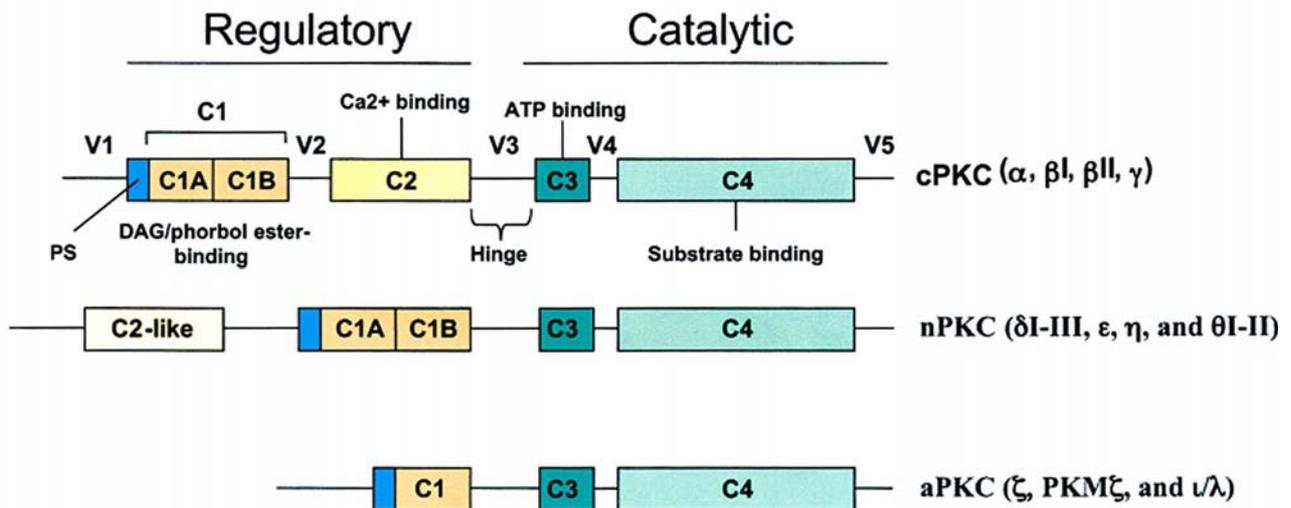


Figure 9. Rappresentazione diagrammatica dei domini delle isoforme di PKC [105].

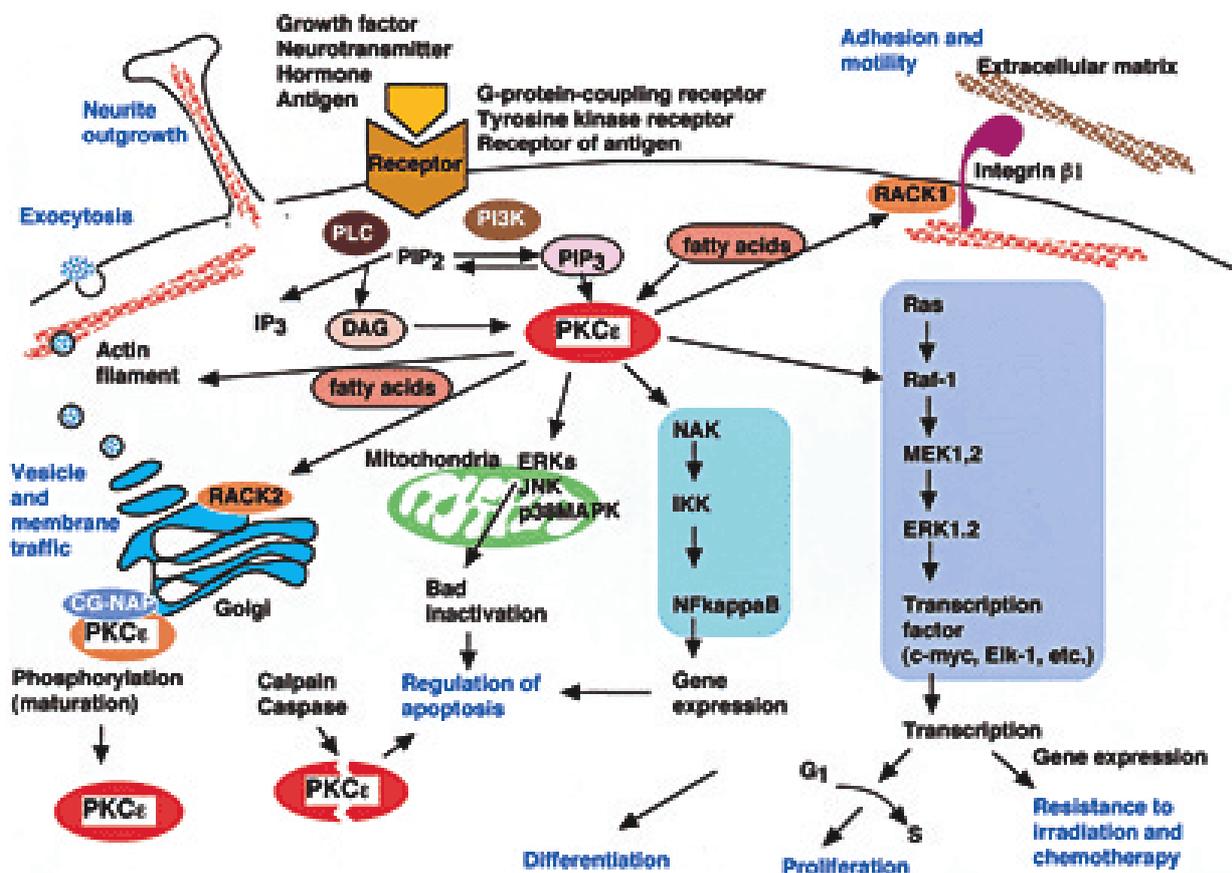
### Regolazione delle PKC

L'attivazione delle PKC sembra interessare la loro traslocazione dall'ambiente citosolico, a quello di membrana; queste traslocazioni possono avvenire in differenti modi e scatenare diversi eventi. Interazioni con la membrana riguardanti forme cataliticamente inattive le quali possono associarsi alla membrana in modo  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente; possono avvenire tramite i domini C1 e C2; alcune interazioni inducono modificazioni conformazionali delle PKC differenti dalla loro conformazione attiva; infine, complessi di membrana mediati dagli esteri del forbolo. L'attività delle PKC è perciò controllata dalla sua compartimentalizzazione all'interno della cellula. E' stato così notato che specifiche proteine hanno la capacità di localizzare e quindi di ancorare le chinasi nel loro sito di azione [106]. Queste proteine includono i recettori per le proteine chinasi C [107], annessine e altre proteine citoscheletriche. Perché una proteina possa essere considerata una RACK, deve possedere alcuni requisiti: deve legare la PKC in presenza di attivatori, il loro legame in vitro non deve essere inibito da peptici pseudosubstrati mentre deve essere specifico e saturabile; infine i RACK dovrebbero contenere sequenze omologhe al motivo di legame della PKC. Per quanto riguarda i vari fattori che possono modulare l'attività delle PKC, sicuramente una categoria molto conosciuta è quella degli esteri del forbolo. Queste sostanze aumentano la capacità delle PKC DAG dipendenti, di penetrare nella membrana cellulare [108]. In particolare è stato osservato che per poter penetrare nella membrana, le PKC necessitano di residui cisteinici e una o più ammine primarie. Oltre agli esteri del forbolo, anche i livelli del  $\text{Ca}^{2+}$  sono critici nell'attivazione delle PKC. Infatti, in condizioni di riposo i livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  sono insufficienti ad attivare le PKC; solo su attivazione recettoriale e conseguente mobilizzazione di  $\text{Ca}^{2+}$ , si ha la migrazione della PKC inattiva dal citosol

verso la membrana plasmatici, con seguente attivazione [109]. In membrana, l'affinità delle PKC per il  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta, in modo da far raggiungere la completa attivazione [110]. Un'altra molto importante classe di attivatori delle PKC sono gli acidi grassi, di cui il più rappresentativo è sicuramente la fosfatidilcolina. E' stato infatti dimostrato che la fosfatidilcolina lega elettrostaticamente sequenze omologhe a quelle del pseudostrato di PKC [111]. Nello specifico solo la fosfatidilcolina in forma *cis*. E' stato così proposto un meccanismo secondo cui gli acidi grassi eserciterebbero il loro effetto a livello del dominio regolatorio della PKC, alterando il legame con il pseudostrato; si ha così lo sblocco del sito catalitico che da come risultato l'attivazione della PKC [112]. Un ulteriore processo che porta all'attivazione della PKC, in maniera del tutto indipendente al  $\text{Ca}^{2+}$  e ai fosfolipidi, avviene attraverso l'ossidazione della proteina tramite l'azione di agenti ossidanti come i perossidi, i periodati e la N-clorosuccinimide. L'enzima diviene costitutivamente attivo [113, 114]. Inoltre, fenomeni come la fosforilazione e la autofosforilazione contribuiscono alla stabilità termica, resistenza a fosfatasi e attività catalitica. Enzimi come la fosfatidilinositolo trifosfato dipendente chinasi 1 (PDK1) possono fosforilare le isoforme di PKC nel loro sito di attivazione carbossi terminale, a cui seguono ulteriori due fosforilazioni (probabilmente sempre mediate da PDK) o autofosforilazioni sempre nella zona carbossi terminale, ben conservati in ogni enzima della famiglia delle PKC [115-117]. Un ulteriore meccanismo di regolazione avviene mediante proteolisi nella regione V3, per mezzo di proteasi attivate dal  $\text{Ca}^{2+}$ , dette anche calpaine [118]. Le calpaine esistono in due isoforme: la calpaina micromolare ( $\mu$ ), che richiede basse concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  per essere attivata, e la calpaina millimolare (m), la quale richiede alte concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  per essere attivata [119]. Queste proteasi formano così un frammento di PKC libero dal dominio regolatorio, che rimane così costantemente attivo, conosciuto come proteina chinasi M (PKM). Inoltre, tutte le isoforme di PKC, eccetto quella  $\delta$ , possiedono sequenze arricchite in proline, serine, treonine e acido glutammico chiamate PEST, le quali sono state implicate nella degradazione proteolitica sia delle calpaine [120], sia del proteosoma [121]. Ulteriore livello di regolazione può essere mediato da reazioni di defosforilazione di PKC attive, che le predispongono alla ubiquitinazione e alla degradazione [122].

## LA PROTEINA CHINASI $\epsilon$

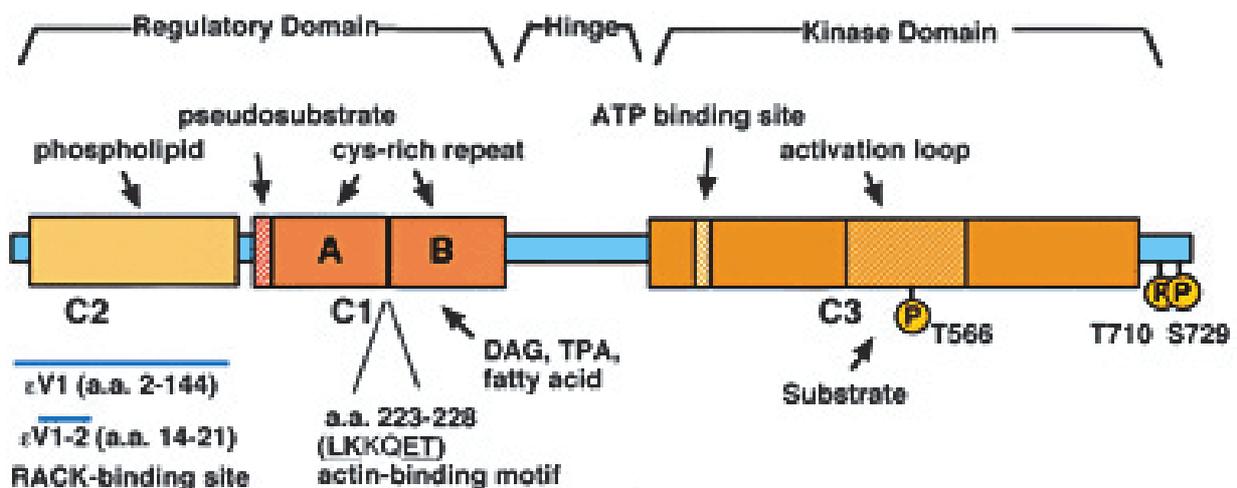
La PKC $\epsilon$  appartiene al gruppo delle nPKC, e quindi sono Ca<sup>2+</sup>-indipendenti ma sensibile all'attivazione da parte degli esteri del forbolo e dal DAG; è espressa in molti tessuti. Il ruolo essenziale della PKC $\epsilon$  è stato stabilito in molti sistemi di trasduzione del segnale che riguardano proliferazione [123], differenziamento [107], espressione genica [124], contrazione muscolare [125], metabolismo [126] trasporto [127], esocitosi [128], endocitosi [129]. Inoltre sempre più dati suggeriscono che la PKC $\epsilon$  abbia ruoli critici in varie malattie come il diabete, ischemia e tumori (Figura 10).



**Figura 10. Trasduzioni del segnale PKC $\epsilon$ -dipendente, in vari tipi cellulari.** La PKC $\epsilon$  è attivata dal DAG, dal PIP3 e dagli acidi grassi che sono generati da vari stimoli cellulari come l'apoptosi, l'adesione e la motilità cellulare [130].

## Struttura, regolazione e attivazione della PKC $\epsilon$

Come per gli altri membri delle PKC, la PKC $\epsilon$  per diventare attiva e responsiva nei confronti dei secondi messaggeri, richiede la fosforilazione di tre siti specifici: treonina 566, serina 729 ed autofosforilazione sul residuo treonina 710 (figura 11). La forma non fosforilata o ipofosforilata, sembrano associarsi direttamente con le aree del centrosoma e del Golgi; fosforilazioni come la treonina 566 e la serina 729 sembrano favorire questa localizzazione. La PKC $\epsilon$  viene in seguito attivata da differenti secondi messaggeri come il DAG, il PIP $_3$  e acidi grassi prodotti da stimoli come il PDGF e la bradichinina [131, 132]. La localizzazione cellulare dipende dal secondo messaggero che è legato al dominio C1; può così traslocare verso la membrana plasmatica in seguito a stimolo di DAG, oppure verso il Golgi in risposta all'acido arachidonico [133]. Inoltre, anche recettori per la PKC $\epsilon$ , come la proteina di membrana del Golgi RACK2 coinvolta nel traffico vescicolare, possono determinare la sua localizzazione [134].



**Figura 11. Struttura della PKC $\epsilon$ .** La sequenza peptidica  $\epsilon$ V1 o  $\epsilon$ V1-2 media il legame alla proteina RACK. DAG ed esteri del forbolo potrebbero avere differente selettività nei confronti dei domini C1A e C1B. Infatti, C1B sembra essere importante per la traslocazione mediata da acidi grassi. La fosforilazione sulla treonina 566 è essenziale per l'attività enzimatica. Le fosforilazioni sui residui treonina 710 e serina 729 sono importanti per la localizzazione e la stabilità della PKC $\epsilon$  [130].

Anche RACK1 può legarsi alla PKC $\epsilon$ , ma con un'affinità di legame minore rispetto a quella per RACK2. Questa associazione, in particolare, viene mediata dal dominio C2 (definito anche V1). La PKC $\epsilon$  possiede anche un motivo di legame con l'actina, localizzato tra il primo e il secondo dominio ricco in cisteine, nel dominio C1; questa associazione avviene in maniera indipendente

dalla fosfatidilserina. [135, 136]. DAG stimola l'associazione con l'actina, la quale, oltre a essere una proteina ancorante, permette alla PKC $\epsilon$  di mantenersi in una conformazione cataliticamente attiva. Anche i domini C1 e C2 agiscono come segnali di localizzazione subcellulare [137].

## IL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO IN CELLULE C2C12

Il differenziamento del muscolo scheletrico è caratterizzato da una serie precisa di eventi. Il primo passaggio include l'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti proliferanti; successivamente, le cellule si allineano fino a fondersi formando così i miotubi multinucleati [138]. Questo tipo di differenziamento è regolato da eventi molecolari, ciascuno caratterizzato dall'attivazione dell'espressione di specifici geni muscolari. I mioblasti proliferanti esprimono fattori di regolazione miogenici (MRF) come MyoD, Myf5 dotati di un motivo *helix-loop-helix* contenenti aminoacidi basici. Una volta attivati, MyoD e Myf5 inducono l'uscita dei mioblasti dal ciclo cellulare e l'espressione di altri fattori di trascrizione importanti ai fini del differenziamento miogenico: la miogenina e le proteine della famiglia MEF2. Questi ultimi formano eterodimeri con proteine E ubiquitarie e attivano il differenziamento miogenico attraverso il legame con specifiche sequenze, le *E-box*, presenti nella regione regolatoria del promotore di geni muscolari [139]. La contrazione del muscolo scheletrico è dovuta alle interazioni fra le teste polari di miosina II e i filamenti adiacenti di actina, a spese dell'idrolisi di ATP catalizzata dalla miosina stessa. Le interazioni molecolari che generano la forza appena descritta avvengono soltanto quando un segnale viene trasmesso al muscolo scheletrico dal suo nervo motore. Questo segnale è mediato da un flusso di ioni  $Ca^{2+}$  nel citosol che dà inizio alla contrazione di ciascuna miofibrilla. La dipendenza dal  $Ca^{2+}$  della contrazione dei muscoli scheletrici è dovuta interamente ad una serie di proteine accessorie specializzate che sono associate strettamente ai filamenti di actina. Una di queste proteine accessorie è la tropomiosina che si lega nella scanalatura dell'elica dell'actina. L'altra proteina principale è la troponina, un complesso formato da tre polipeptidi: la troponina T, capace di legare la tropomiosina; la troponina C, capace di legare il  $Ca^{2+}$ ; e la troponina I, con attività di inibizione. La troponina T può essere considerata un'affidabile marker del differenziamento miogenico [140]. Per quanto riguarda il processo dell'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti, passaggio necessario affinché il differenziamento possa avvenire, un ruolo fondamentale è stato dimostrato essere svolto dalla proteina ciclina D3. A differenza di tutte le altre cicline di tipo D, che diminuiscono i loro livelli di espressione per permettere l'arresto del ciclo cellulare in fase  $G_0/G_1$  durante il differenziamento miogenico, l'espressione della ciclina D3 aumenta durante tutto il differenziamento miogenico. Infatti, è stato dimostrato che la ciclina D3 agisce come un inibitore delle cicline chinasi D (CDKs) attraverso la formazione di un complesso che sequestra proteine come la CDK4, PCNA e pRB, permettendo così l'uscita dei mioblasti dal ciclo cellulare [141].

# **SCOPO DELLA RICERCA**

L'uscita dal ciclo cellulare durante il differenziamento miogenico, è prerequisito fondamentale al fine di ottenere un completo differenziamento muscolare. Una delle proteine implicate in questo processo è la ciclina D3. E' noto che l'espressione della ciclina D3 aumenta durante il differenziamento miogenico. Inoltre, è stato dimostrato che la ciclina D3 ha un ruolo fondamentale nel mantenimento dello stato differenziativo [141]. Recentemente abbiamo dimostrato che la PLC $\beta$ 1 e la PLC $\gamma$ 1 sono in grado di modulare la trascrizione del gene della ciclina D3 [142]. Lo scopo di questo studio è stato quello di capire attraverso quale via di trasduzione del segnale la PLC $\gamma$ 1 è in grado di modulare l'attivazione del promotore della ciclina D3. Risulta sempre più evidente dalla letteratura che la PLC $\gamma$ 1 e la PKC $\epsilon$  si trovano a cooperare nelle stesse vie di trasduzione [143-145], e che l'attivazione, nonché traslocazione della PKC $\epsilon$  sono correlate a stimoli di insulina [146, 147]. Abbiamo quindi studiato il ruolo della PKC $\epsilon$ , durante il differenziamento miogenico indotto da insulina e il suo coinvolgimento nella via di trasduzione del segnale che porta all trascrizione del gene della ciclina D3 attraverso il signaling della PLC $\gamma$ 1. Grazie a tecniche di frazionamento cellulare, studi di interazione proteina-proteina, silenziamento genico, saggi d'attività enzimatici e metodiche di biologia molecolare abbiamo cercato di stabilire se la trascrizione genica della ciclina D3 sia il risultato di una serie di segnali molecolari indotti dall'insulina attraverso l'attivazione della PLC $\gamma$ 1 e mediati dalla PKC $\epsilon$ .

# **MATERIALI E METODI**

## MATERIALI

I terreni di coltura, l'insulina, gli antibiotici, il siero fetale bovino (FBS), gli inibitori delle proteasi e fosfatasi, il ditiotritolo, i detergenti, l'albumina di siero bovino (BSA), il poli(dI-dC) e tutti i reagenti non specificamente contrassegnati, provengono dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Il kit per la rivelazione in chemiluminescenza (ECL) Lumi-Light<sup>Plus</sup>, proviene dalla Roche Applied Science (Milano, Italia). Il [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP e il glutatione (GSH)-sefarosio 4B provengono dall'Amersham Biosciences (Milano, Italia). Il kit per il dosaggio spettrofotometrico delle proteine proviene dalla BioRad (Hercules, CA USA). Il tampone di lisi MPER dalla Pierce (Rockford, IL). L'anticorpo anti-*rabbit* IgG Cy3 coniugato, l'anticorpo anti-*mouse* FITC coniugato, gli anticorpi anti-*mouse* e anti-*rabbit* IgG coniugati alla perossidasi, la proteina mielina basica (MBP), l'anticorpo monoclonale anti- $\beta$ -tubulina e quello anti-Golgi 58K sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). L'anticorpo policlonale anti-fosfoPKC $\epsilon$  (ser729) dalla Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), ATP non radioattiva e l'anticorpo policlonale anti-CcoI dalla Cell Signaling Technology (CTS) (Beverly, MA, USA). L'anticorpo monoclonale anti-PLC $\gamma$ 1, l'anticorpo policlonale anti-PLC $\gamma$ 1, l'anticorpo policlonale anti-PKC $\epsilon$ , l'anticorpo policlonale anti-ciclina D3, gli oligonucleotidi sintetici SP1, AP2 $\alpha$  e NF-kB, i domini SH2SH2-GST (glutatione transferasi) e SH3-GST, la proteina A/G-agarosio, gli siRNA della PKC $\epsilon$  e gli siRNA controllo negativo provengono dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). I reagenti per la trasfezione mediante elettroporazione e il plasmide codificante per la GFP provengono dall'Amaxa (Germany Koeln). Il plasmide pcDNA3 contenente il gene della resistenza alla neomicina proviene dalla Invitrogen (Carlsbad, CA). L'antibiotico G418 proviene dalla GIBCO (Carlsbad, CA). Il kit hGH ELISA e la chinasi T4 polinucleotide provengono dalla Roche (Indianapolis, IN). Il plasmide PMJ30-PLC $\gamma$ 1 codificante per la isoforma di ratto di PLC $\gamma$ 1 è stato gentilmente fornito dal gruppo di ricerca del Prof. P.G. Suh (Pohang University of Science and Technology, Korea). I plasmidi codificanti per la forma murina di GFP-PKC $\epsilon$  e la forma cataliticamente inattiva di tale enzima, ovvero la GFP-PKC $\Delta\epsilon$  sono stati gentilmente forniti dal gruppo di ricerca del Prof. Prisco (Università degli studi di Parma, Parma, Italia). Il plasmide contenente il promotore -1680 (pD3GH) e -37 (pD3-37) della ciclina D3 fusi al gene reporter ormone della crescita umano (hGH) e il pCMV $\beta$ -gal sono stati gentilmente forniti dal gruppo di ricerca della Prof. Ravid (Boston University School of Medicine, Boston, MA, United States).

## **METODI**

### **Colture Cellulari**

Le cellule mioblastiche murine C2C12 sono state coltivate in D-MEM contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) e addizionato di antibiotici. La linea cellulare è stata coltivata in incubatore a 37° C in atmosfera umidificata e con pressione parziale di CO<sub>2</sub> pari al 5%. Per il differenziamento cellulare, le colture sono state trattate con terreno privo di siero contenente insulina (100 nM).

### **Frazionamento cellulare**

Le cellule C2C12 sono state risospese in 10 mM Tris/HCl pH= 7.4, 10 mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), 10 µg/ml di inibitore di tripsina di soia, 1µg/ml di aprotinina e leupeptina, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM NaF e 20 nM di acido ocadaico. Le cellule sono state incubate per 20 min in ghiaccio, quindi omogenizzate con ago da 25g per 40 volte. La frazione nucleare è stata rimossa dall'omogenato totale mediante centrifugazione a 400 x g per 6 min a 4°C. Il sopranatante contenente la frazione citoplasmatica è stato raccolto e successivamente centrifugato a 20000 x g per 30 min a 4°C. Il sopranatante è stato raccolto e considerato come la frazione di membrana leggera; il pellet, risospeso nello stesso tampone iniziale addizionato all'1% di triton, viene lasciato incubare per 30 min in ghiaccio. Si centrifuga a 20000 x g per 30 min a 4°C e il sopranatante viene raccolto e considerato come la frazione di membrana pesante.

### **Preparazione degli omogenati totali**

Le cellule C2C12 sono state lisate con MPER contenente gli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (aprotinina, leupeptina entrambi 10 µg/ml, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e 20 nM acido ocadaico). I lisati sono stati lasciati incubare in ghiaccio per 30 min e poi centrifugati per 10 min a 14000 x g a 4°C per eliminare i residui cellulari.

### **Determinazione delle proteine**

La determinazione della quantità di proteine totali presenti nei campioni è stata condotta con il kit di dosaggio fornito dalla Bio-Rad, seguendo le istruzioni del produttore. Le quantità di proteine nei campioni vengono valutate interpolando le assorbanze a 595 nm da una curva standard di BSA. Il campione da analizzare è portato ad un volume finale di 10 µl con acqua distillata e trasferito nell'apposita cuvetta. Nella cuvetta del campione bianco vengono posti 10 µl di H<sub>2</sub>O. In tutti i

campioni per la determinazione delle proteine viene aggiunto 1 ml di reagente di Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250): su vortex. I campioni vengono lasciati per 2 min a temperatura ambiente prima della lettura allo spettrofotometro.

### **Immunoprecipitazione**

Le cellule C2C12 sono state lisate per 30 min a 4°C in tampone RIPA [50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 10% glicerolo, 0.5% Na deossicolato, 20 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 1% NP-40, 10 µg/ml di inibitori delle proteasi]. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 14000 x g per 30 min a 4°C. In seguito, i campioni sono stati preincubati con 20 µl di proteina A/G-agarosio per 1 ora a 4°C e centrifugati per 5 min alla massima velocità a 4°C. I campioni sono stati incubati con l'anticorpo primario (1 µg/mg lisato) su bascula rotante una notte a 4°C. In seguito i campioni sono stati incubati con 20 µl di proteina A/G-agarosio in agitazione a 4°C per 3 ore. Gli immunoprecipitati sono stati lavati 4 volte in 50 mM Tris Hcl, pH=7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Na deossicolato, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 1 mM PMSF. I campioni sono poi stati separati mediante SDS-PAGE, e analizzati mediante western blot.

### **Pull Down**

Le cellule C2C12 sono state lisate per 30 min a 4°C in tampone RIPA [50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 10% glicerolo, 0.5% Na deossicolato, 20 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 1% NP-40, 10 µg/ml di inibitori delle proteasi]. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 14000 x g per 30 min a 4°C. In seguito, i campioni sono stati incubati su bascula rotante una notte a 4°C con 2 µg di GST-proteina ricombinante purificata. In seguito ai campioni sono stati aggiunti 20 µl di GSH-sefarosio 4B (50%) in agitazione a 4°C per 3 ore. Il complesso formatosi è stato lavato 3 volte in 50 mM Tris Hcl, pH=7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Na deossicolato, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 1 mM PMSF. I campioni sono poi stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati mediante western blot.

### **Saggio di attività della PKCε in vitro**

In seguito al trattamento di differenziamento, le cellule sono state lisate in un tampone contenente 20 mM Tris pH=7.5, 10% glicerolo, 1% NP40, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 5 mM sodio pirofosfato, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina A, 1 mM PMSF a 4 °C per

30 min e poi centrifugate a 14000 x g per 30 min a 4°C. La PKCε endogena è stata immunoprecipitata con anticorpo anti-PKCε (1 ug/mg lisato) per 3 ore con successivi 20 ul di proteina A/G-agarosio per 2 ore a 4°C. Gli immunoprecipitati sono stati lavati 3 volte con 50 mM Tris Hcl pH 7.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 1 mM PMSF e 2 volte con il tampone del saggio di attività contenente 20 mM Tris pH=7.4, 50 mM NaCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA e 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>. I campioni sono stati, sia separati mediante 12.5 % SDS-PAGE, sia usati per misurare l'attività enzimatica. Per il saggio di attività a 30 ul di PKCε immunoprecipitata sono stati aggiunti 5 ug di substrato MBP, 20 uM di ATP non radioattiva e 1 uCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. La reazione di fosforilazione avviene a 30°C per 20 min. La reazione viene fermata con 10 ul di tampone SDS e successivamente separata mediante SDS-PAGE al 12.5%. I livelli di fosforilazione di MBP sono stati rivelati mediante autoradiografia.

### **Western Blot**

Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e successivamente trasferite su una membrana di nitrocellulosa usando. Le membrane sono state incubate con PBS contenente 5% latte scremato per 60 min per saturare i siti aspecifici. Successivamente le membrane sono state incubate in presenza degli specifici anticorpi primari durante la notte a 4°C., Le membrane sono state lavate per 4 volte con PBS/0.1% Tween-20, quindi incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi, diluito 1:5000 in PBS/0.1% Tween-20, e poi lavati come sopra.. Successivamente la presenza delle proteine è stata rivelata in chemiluminescenza visualizzata mediante Kodak Image Station 2000R.

### **Immunofluorescenza in situ**

Le cellule C2C12 sono state fatte crescere su vetrini coprioggetto, lavate due volte con PBS freddo, fissate per 30 min a temperatura ambiente con paraformaldeide 4% preparata al momento, e permeabilizzate con 0.1% Triton X-100 in PBS per 10 min a temperatura ambiente. Successivamente i campioni sono stati saturati per 1 ora a temperatura ambiente con 3% BSA in PBS e incubati per tutta la notte a 4°C in presenza dell'anticorpo primario opportunamente diluito in 3% BSA in PBS. L'anticorpo secondario anti-*rabbit* IgG Cy3-coniugati in PBS e anti-*mouse* FITC coniugati opportunamente diluiti sono stati incubati 1 ora a 37°C in soluzione 3% BSA. L'incubazione con DAPI (0.1 µg/ml) è stata eseguita per 5 min a temperatura ambiente su tutti i campioni, per evidenziare i nuclei. I vetrini sono stati montati su portaoggetto e sono stati esaminati

tramite un microscopio a fluorescenza Zeiss Axio Imager.Z1. L'elaborazione dell'immagine è stata eseguita tramite il software Zeiss Axio Vision (4.4).

### **Trasfezione cellulare**

Le cellule sono state trasfettate mediante elettroporazione. Brevemente,  $1 \times 10^6$  cellule sono state risospese in 100  $\mu$ l di nucleofector solution V e addizionate di 2  $\mu$ g di DNA o siRNA ed elettroporate con il programma B32. Cloni stabili di cellule trasfettate con il plasmide contenente il promotore intero della ciclica D3 o suoi frammenti, sono stati ottenuti attraverso co-trasfezione col plasmide pcDNA3, il quale possiede il gene della resistenza alla neomicina. Inoltre, le diverse efficienze di trasfezione sono state normalizzate attraverso cotrasfezione con il gene che codifica per la galattosidasi. L'espressione di hGH è stata misurata in presenza di insulina attraverso ELISA. Un decimo del lisato cellulare è stato utilizzato per determinare l'attività della galattosidasi.

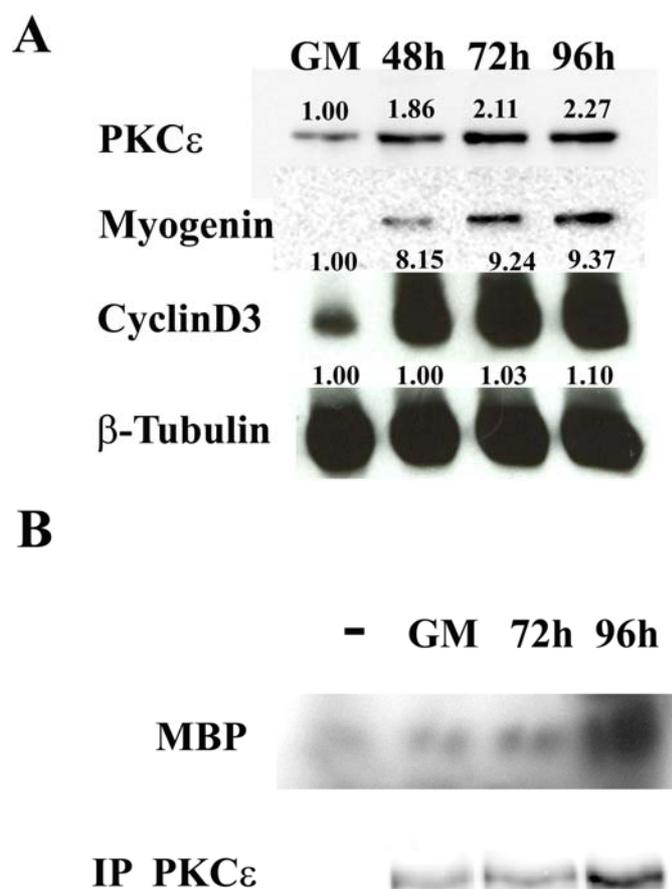
### **Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Gli estratti nucleari sono stati preparati risospendendo le cellule in tampone ipotonico [10 mM Hepes pH=7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF] per 10 min in ghiaccio. I lisati sono stati poi vortexati 10 sec e centrifugati 6 min a 400 x g a 4°C. I nuclei sedimentati sono stati risospesi in tampone ipertonico [20 mM Hepes pH=7.9, 25% glicerolo, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF] e incubati in ghiaccio per 30 min. I lisati sono stati centrifugati a 14000 x g per 10 min a 4°C e i sopranatanti raccolti e conservati a -70°C. Come sonde sono stati impiegati oligonucleotidi sintetici contenenti la sequenza di legame specifica per il fattore di trascrizione analizzato, in particolare AP2 $\alpha$  e NF-kB. Queste sonde sono state marcate con [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP usando la T4 polinucleotide chinasi. La reazione tra la sonda e l'estratto nucleare avviene in un tampone contenente 20 mM Hepes pH=7.6, 70 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% NP40, 12% glicerolo, 1 mg/ml BSA, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, a cui è stato aggiunto 1  $\mu$ g di poli(dI-dC) e 10  $\mu$ g di estratto nucleare. Nel controllo è stata aggiunta una quantità 100 volte superiore di sonda non marcata rispetto a quella marcata. Il complesso è stato successivamente incubato 20 min a temperatura ambiente, mentre nei controlli è stata fatta una preincubazione di 10 min con solo la sonda fredda. In seguito, i complessi sono stati separati a 4°C su un gel di poliacrilammide al 4% in condizioni non denaturanti; dopo la corsa il gel è stato asciugato e visualizzato mediante autoradiografia.

# RISULTATI

## Analisi dell'espressione proteica e dell'attività enzimatica della PKC $\epsilon$ durante il differenziamento miogenico indotto da insulina in cellule C2C12

Come prima indagine, si è voluto valutare l'espressione e l'andamento della PKC $\epsilon$  durante il differenziamento miogenico indotto da insulina, in cellule C2C12. Utilizzando la tecnica del western blot sono stati analizzati i livelli di espressione della PKC $\epsilon$  in omogenati totali di C2C12 non differenziate e differenziate a vari tempi, in particolare dopo 48, 72 e 96 ore. Dai risultati ottenuti si è potuto constatare la presenza della PKC $\epsilon$  in tutti gli omogenati, differenziati e non; inoltre, l'espressione della PKC $\epsilon$  aumenta durante tutto il periodo del differenziamento miogenico (Figura 12A).



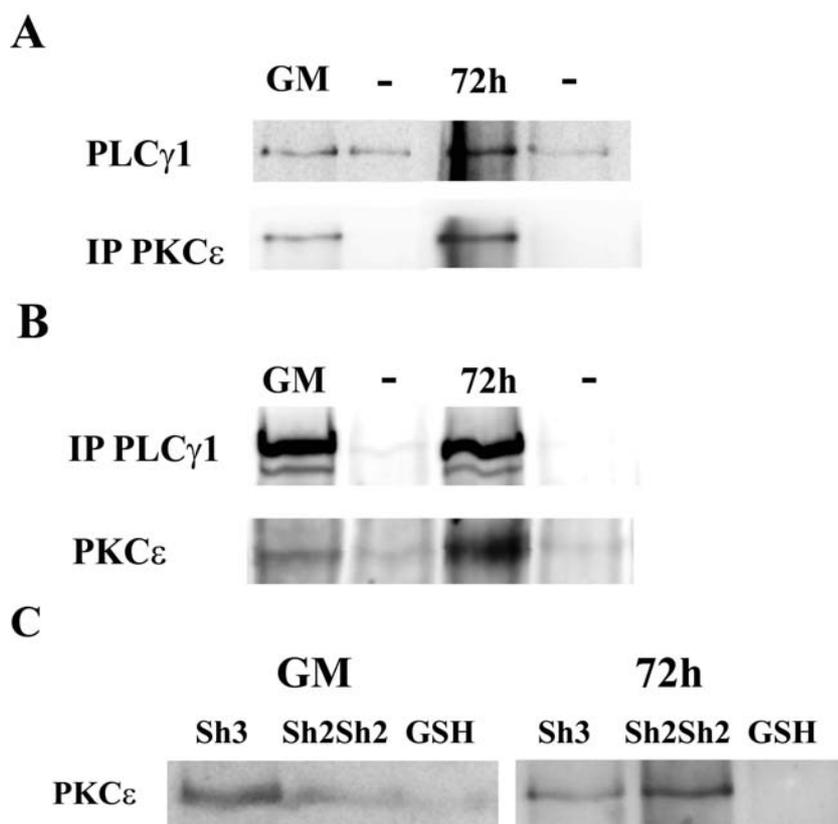
**Figura 12. Espressione proteica ed attività catalitica della PKC $\epsilon$  in cellule C2C12 indotte al differenziamento.** A: analisi in western blot della PKC $\epsilon$  endogena, della  $\beta$ -tubulina, della ciclina D3 e della miogenina in cellule ciclanti (GM) e in cellule differenziate a 48, 72 e 96 ore di insulina. Sono stati caricati 30  $\mu$ g di proteina per ogni corsia. B: analisi dell'attività catalitica attraverso l'immunoprecipitazione (IP) della PKC $\epsilon$ ; nel controllo negativo (-) dell'immunoprecipitato è stato omesso l'anticorpo anti-PKC $\epsilon$ .

Per confermare che le cellule in seguito a stimolo di insulina si fossero effettivamente differenziate, gli omogenati sono stati saggiati anche per la presenza di marcatori del differenziamento miogenico quali la miogenina e la ciclina D3. Inoltre, essendo la miogenina un marcatore esclusivamente presente in cellule differenziate, non lo si dovrebbe trovare nei mioblasti. Il risultato indica che entrambe le proteine incrementano durante il differenziamento delle C2C12, e che la miogenina risulta assente nelle cellule indifferenziate (Figura 12A).

Abbiamo deciso quindi di verificare se ad un aumento di espressione della PKC $\epsilon$  corrispondesse un aumento dell'attività catalitica. I dati ottenuti dal saggio d'attività confermano che durante le fasi di differenziamento, l'attività della PKC $\epsilon$  aumenta all'aumentare della sua espressione; parallelamente è stata valutata anche la presenza della PKC $\epsilon$  negli immunoprecipitati (Figura 12B).

### **La PKC $\epsilon$ e la PLC $\gamma$ 1 interagiscono attraverso i domini SH della PLC $\gamma$ 1**

In seguito, mediante tecnica di immunoprecipitazione, è stata valutata la capacità di interazione proteina-proteina tra la PKC $\epsilon$  e la PLC $\gamma$ 1, sia in mioblasti che in miotubi. Il risultato mostra che entrambe le proteine fanno parte di uno stesso complesso e che le quantità delle due proteine all'interno del complesso aumenta durante il differenziamento (Figura 13A-B). Questo significa che l'espressione delle due proteine aumenta durante il differenziamento miogenico, nello stesso compartimento cellulare. Inoltre, è stato notato che il complesso PLC $\gamma$ 1-PKC $\epsilon$  si forma solo immunoprecipitando il complesso utilizzando l'anticorpo anti-PLC $\gamma$ 1, anticorpo che non riconosce e non interagisce con i domini SH. Ci siamo chiesti attraverso quale dominio SH poteva avvenire la formazione del complesso. Mediante l'utilizzo di proteine ricombinanti dei domini SH2SH2 e SH3 fuse alla proteina GST abbiamo stabilito che in cellule non differenziate l'interazione sembrava essere modulata dal dominio SH3, mentre in cellule differenziate a 72 ore l'interazione era mediata dal dominio SH2SH2 (Figura 13C). Il risultato mette in evidenza, oltre alla sequenza consenso di legame per il dominio SH2 già conosciuta [145], anche un motivo ricco di residui prolinici - PPFKP- nella regione C-terminale

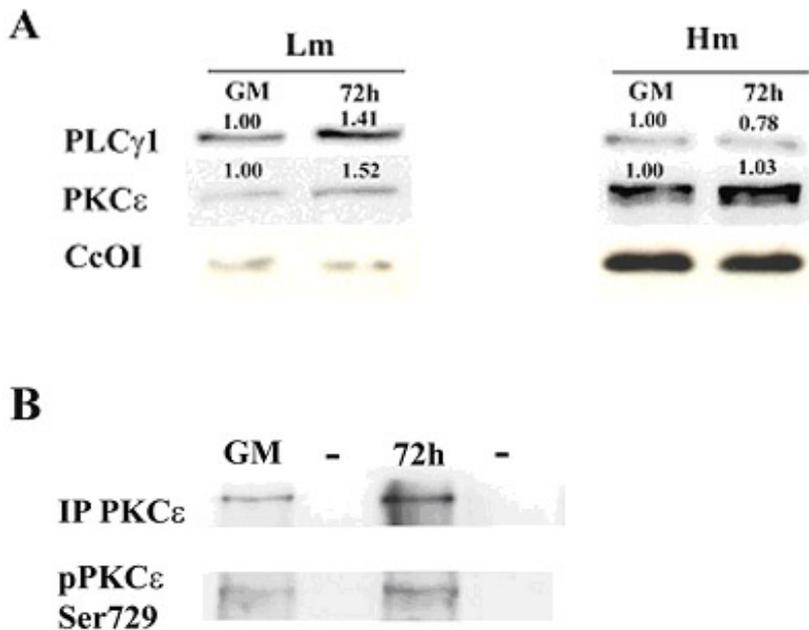


**Figura 13. Co-immunoprecipitazione della PKC $\epsilon$  e della PLC $\gamma$ 1 e pull down con domini SH della PLC $\gamma$ 1, in cellule C2C12 ciclanti (GM) e differenziate a 72 ore.** A: immunoprecipitazione con anticorpo anti-PKC $\epsilon$  e rivelazione con anticorpo anti-PLC $\gamma$ 1. B: immunoprecipitazione con anticorpo policlonale anti-PLC $\gamma$ 1 e rivelazione con anticorpo anti-PKC $\epsilon$ . Nel controllo negativo (-) degli immunoprecipitati è stata aggiunta solo la proteina A/G. C: pull down dei domini SH2SH2, SH3 e successiva rivelazione con anticorpo anti-PKC. Al controllo negativo (GSH) è stato aggiunto solo il GSH-sefarosio.

### **Il complesso PKC $\epsilon$ -PLC $\gamma$ 1 aumenta a livello perinucleare durante il differenziamento miogenico**

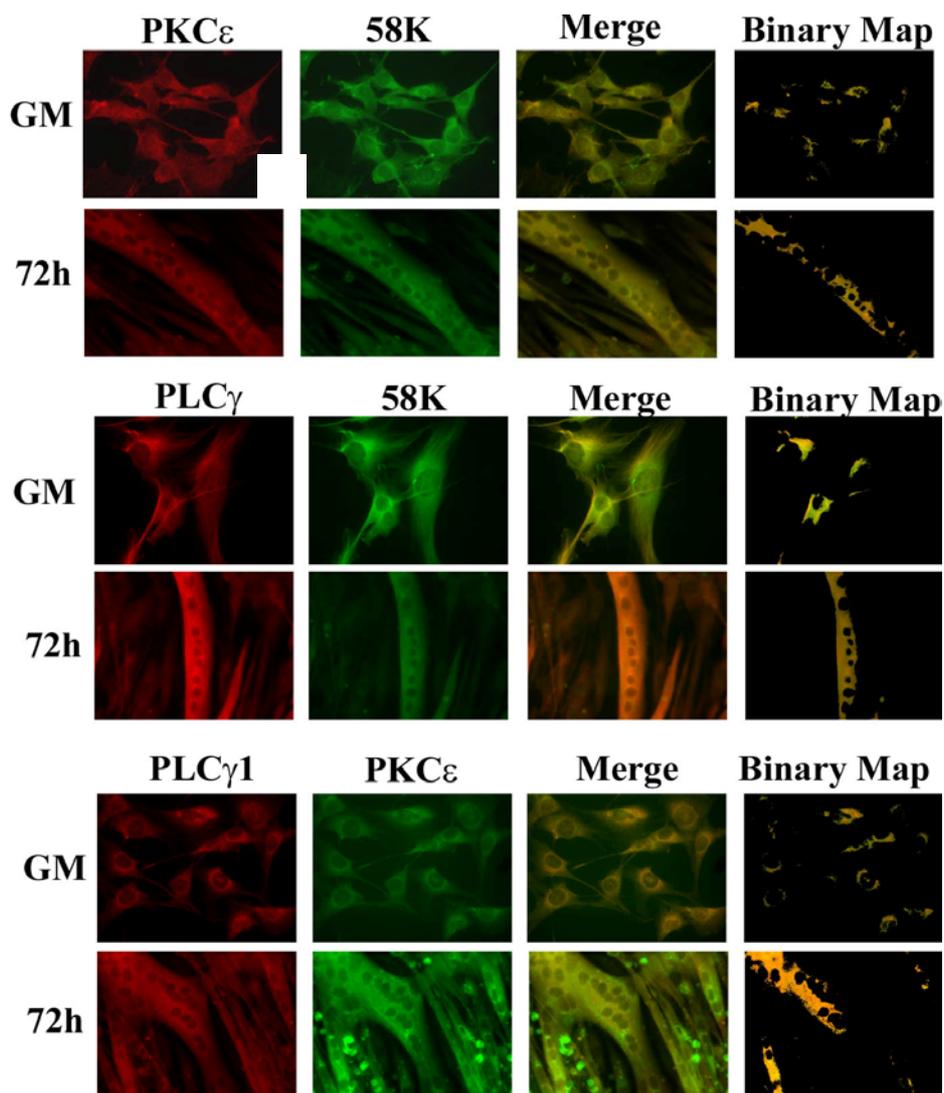
Per studiare la localizzazione del complesso PKC $\epsilon$ -PLC $\gamma$ 1, è stato fatto inizialmente il frazionamento cellulare di cellule differenziate e non. In questo frazionamento è stata scartata la frazione nucleare, in quanto, da una prima indagine si era già notato che le proteine localizzavano maggiormente a livello citoplasmatico, sia in mioblasti che nei miotubi. Il compartimento citoplasmatico è stato ulteriormente centrifugato per ottenere una frazione pesante di membrana, contenente mitocondri, perossisomi, lisosomi e porzioni di membrana plasmatica. Il resto è stato considerato come frazione leggera di membrana, ovvero la parte citoplasmatica contenente piccole membrane come il Golgi e il reticolo endoplasmatico. Attraverso la metodica del western blot è stato rilevato che l'espressione della PKC $\epsilon$  e della PLC $\gamma$ 1 aumenta nella frazione leggera di

membrana durante il differenziamento. Come controllo delle frazioni è stata utilizzata la citocromo ossidasi I, la quale è presente quasi esclusivamente nei mitocondri (Figura 14A). In seguito a questo risultato, siamo andati a valutare la fosforilazione del residuo serinico 729 sia in cellule differenziate, sia in cellule ciclanti poiché la fosforilazione di questo residuo è stata correlata alla localizzazione della PKC $\epsilon$  nell'apparato del Golgi [148].



**Figura 14. Frazionamento della PKC $\epsilon$ , della PLC $\gamma$ 1 e fosforilazione sulla serina 729 della PKC $\epsilon$  in cellule C2C12 ciclanti (GM) e differenziate a 72 ore con insulina.** A: analisi in western blot delle proteine PKC $\epsilon$  e PLC $\gamma$ 1 nelle frazioni di membrana leggera (Lm) e pesanti (Hm); come controllo del frazionamento è stata utilizzata la CcOI, contenuta maggiormente nella frazione pesante di membrana. Sono stati caricati 20  $\mu$ g di proteina per ogni corsia. B: immunoprecipitazione con anticorpo anti-PKC $\epsilon$  e rivelazione con anticorpo anti-fosfoPKC $\epsilon$  serina 729; nel controllo negativo (-) degli immunoprecipitati è stata aggiunta solo la proteina A/G.

Pertanto, la PKC $\epsilon$  è stata immunoprecipitata e poi attraverso il western blot abbiamo valutato il grado di fosforilazione del residuo serinico 729 per mezzo di un anticorpo specifico. Il risultato mostra che la fosforilazione su questo residuo aumenta durante il differenziamento miogenico (Figura 14B). Infine abbiamo utilizzato la tecnica dell'immunofluorescenza per valutare una possibile co-localizzazione della PKC $\epsilon$  e della PLC $\gamma$ 1 con un marcatore specifico del Golgi, in particolare la proteina 58K. Il risultato ha mostrato una co-localizzazione della PKC $\epsilon$  e della PLC $\gamma$ 1 a livello citoplasmatico in cellule ciclanti come anche in quelle differenziate, in cui l'espressione di entrambe le proteine è più forte. Inoltre, si è potuto notare la co-localizzazione di entrambe le proteine con la proteina Golgi 58K (Figura 15). Tutti questi risultati indicano che la localizzazione del complesso PKC $\epsilon$ -PLC $\gamma$ 1 avviene a livello perinucleare, in particolare al livello del Golgi.

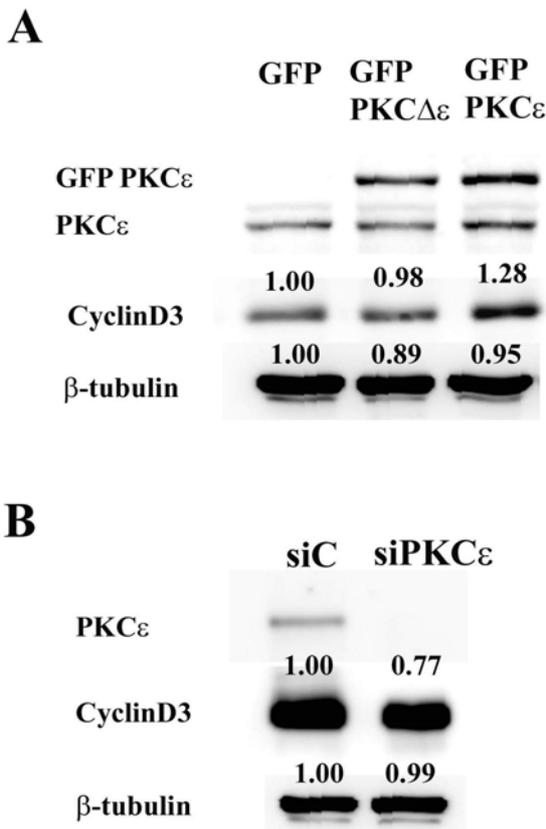


**Figura 15. La PKC $\epsilon$  e la PLC $\gamma$ 1 co-localizzano con la proteina Golgi-58K in cellule C2C12 ciclanti (GM) e differenziate a 72 ore con insulina.** Sono stati utilizzati l'anticorpo secondario anti-*mouse* FITC per rivelare la 58K e l'anticorpo della PLC $\gamma$ 1 e l'anticorpo secondario anti-*rabbit* Cy3 per rilevare la PKC $\epsilon$  e la PLC $\gamma$ 1. L'immagine sovrapposta dei due fluorocromi (merge) rappresenta la co-localizzazione. L'immagine è stata analizzata dal programma Zeiss Axio Vision al fine di ottenere solo il segnale della effettiva co-localizzazione (binary map).

### **L'espressione della PKC $\epsilon$ influenza l'espressione della ciclina D3 durante il differenziamento miogenico**

Dopo aver stabilito che sia la PKC $\epsilon$  che la PLC $\gamma$ 1 appartengono ad uno stesso complesso e che il loro livello di espressione aumenta durante il differenziamento miogenico, ci siamo chiesti se anche la PKC $\epsilon$ , come già dimostrato in precedenza per la PLC $\gamma$ 1 [142], modulasse l'espressione della ciclina D3, in condizioni di differenziamento muscolare. A questo proposito abbiamo utilizzato un vettore di espressione eucariotico che contenevano il gene della PKC $\epsilon$  *wild type*, e un vettore in cui è stato clonato il DNA della PKC $\epsilon$  mutato nel sito catalitico. In seguito a trasfezione con i plasmidi

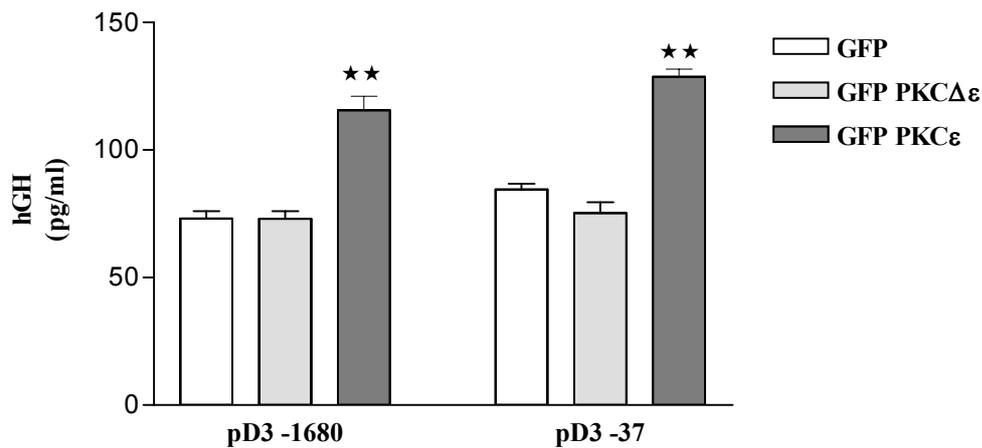
sopra descritti, siamo andati a determinare l'espressione della ciclina D3, dopo 48 ore dalla trasfezione, e dopo 24 ore di differenziamento miogenico. Il risultato è stato che solo la PKC $\epsilon$  *wild type* induce una maggiore espressione della ciclina D3. Pertanto l'incremento della ciclina D3 è dipendente non solo dal grado di espressione della PKC $\epsilon$  ma anche dalla sua attività catalitica (Figura 16A). Per confermare ulteriormente il dato, abbiamo utilizzato anche un approccio che ci permettesse di far diminuire specificamente i livelli di espressione della PKC $\epsilon$ ; attraverso il silenziamento genico, mediato da siRNA, si è ottenuto il calo di espressione della PKC $\epsilon$  nelle C2C12 trasfettate. E' stata quindi valutata l'espressione della ciclina D3 nelle stesse condizioni sperimentali in cui era stata iperespressa la PKC $\epsilon$ . Il risultato ottenuto ha mostrato che, al calo di espressione della PKC $\epsilon$ , corrisponde un calo di espressione della ciclina D3 (Figura 16B). E' stato così stabilito che l'espressione della ciclina D3, in condizioni di differenziamento miogenico, viene influenzata dai livelli proteici e dall'attività catalitica della PKC $\epsilon$ .



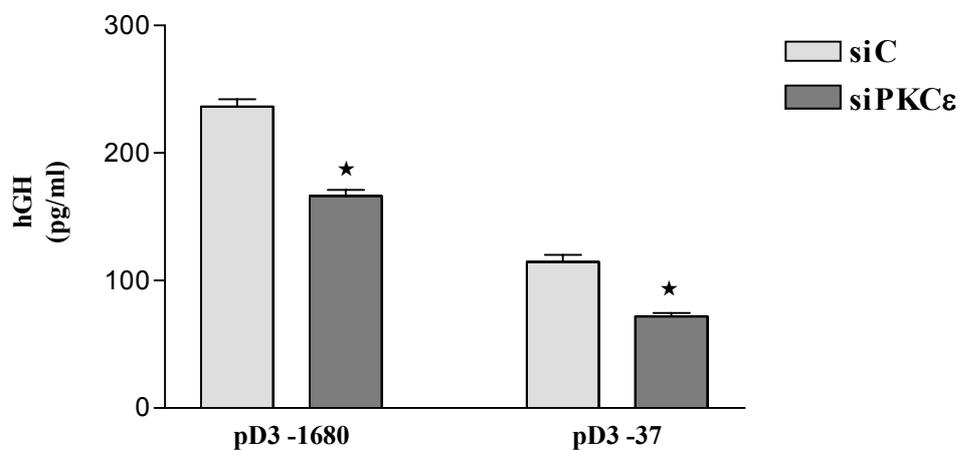
**Figure 16. Effetti dell'amplificazione e del silenziamento della PKC $\epsilon$  sulla espressione della ciclina D3 in cellule C2C12 indotte al differenziamento.** A: analisi in western blot delle proteine PKC $\epsilon$ ,  $\beta$ -tubulina e ciclina D3, a 48 ore dalla trasfezione con vettore di espressione contenente il cDNA della GFP-PKC $\epsilon$  e del mutante cataliticamnte inattivo GFP-PKC $\Delta\epsilon$ . B: analisi in western blot delle proteine PKC $\epsilon$ ,  $\beta$ -tubulina e ciclina D3, a 48 ore dalla trasfezione con siRNA specifico nei confronti della PKC $\epsilon$  (siPKC $\epsilon$ ) e con siRNA controllo (siC). In entrambi gli esperimenti le C2C12 sono state stimulate a differenziare per 24 h

## **La PKC $\epsilon$ modula l'attivazione del promotore della ciclina D3, in particolare attraverso la regione -37**

Precedenti studi hanno indicato che la PLC $\gamma$ 1 attiva il promotore della ciclina D3 attraverso regioni ben specifiche del promotore stesso [142]. Attraverso l'utilizzo di vettori di espressione eucariotica contenenti la sequenza intera del promotore della ciclina D3 o suoi frammenti, fusi con un gene reporter quale l'ormone hGH, il quale può essere facilmente quantificato mediante la tecnica ELISA, è stata studiata l'attivazione del promotore stesso, sia in condizioni di iperespressione della PKC $\epsilon$ , sia in condizioni di silenziamento della stessa. L'attivazione del promotore è stata determinata dopo 48 ore di trasfezione, ventiquattro delle quali in condizioni di differenziamento miogenico. Il primo esperimento è stato fatto iperesprimendo la PKC $\epsilon$  e andando a valutare l'attività sia sull'intero promotore, sia sul frammento del promotore più piccolo su cui la PLC $\gamma$ 1 è ancora attiva, in particolare il frammento -37. Il risultato ha mostrato che si ottiene un incremento dell'attivazione del promotore, e quindi un aumento di produzione di hGH, sia sull'intero promotore, sia sul frammento -37. Inoltre, il mutante cataliticamente inattivo della PKC $\epsilon$  si è dimostrato inefficace, mostrando come l'attivazione nei confronti del promotore della ciclina D3 sia dipendente dall'attività della PKC $\epsilon$  (Figura 17). In maniera opposta, silenziando la PKC $\epsilon$  si ottiene un'inibizione della produzione dell'hGH sia per quanto riguarda l'intero promotore, sia per il frammento -37, che mostra così un'inibizione dell'attivazione del promotore della ciclina D3 (Figura 18). Questi risultati dimostrano che la PKC $\epsilon$  è un importante fattore nei confronti dell'attivazione del promotore della ciclina D3. Ancora una volta la PKC $\epsilon$  appare un enzima chiave nella regolazione della ciclina D3 durante il differenziamento muscolare scheletrico.



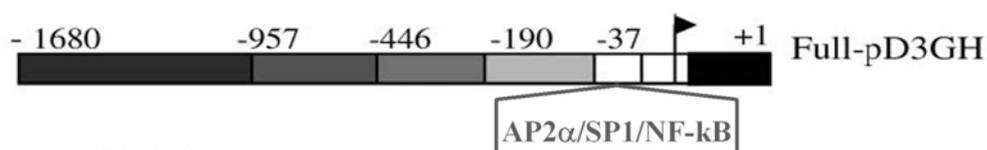
**Figura 17. Effetti della iperespressione della PKCε sulla produzione dell'hGH legata all'attivazione dell'intero promotore della ciclina D3 e del suo frammento -37, in C2C12 indotte al differenziamento.** Le cellule sono state trasfettate con il vettore di espressione per la GFP, GFP PKCε e per la GFP PKCΔε. Dopo 48 ore dalla trasfezione, di cui 24 in condizioni di differenziamento, il surnatante dei vari campioni è stato determinato per l'ormone hGH (barre +/- SEM; n=3. \*\*=P<0.01).



**Figura 18. Effetti del silenziamento della PKCε sulla produzione dell'hGH legata all'attivazione dell'intero promotore della ciclina D3 e del suo frammento -37, in C2C12 indotte al differenziamento.** Le cellule sono state trasfettate sia con siRNA specifico nei confronti della PKCε (siPKCε), sia con siRNA controllo (siC). Dopo 48 ore dalla trasfezione, di cui 24 in condizioni di differenziamento, il surnatante dei vari campioni è stato determinato per l'ormone hGH (barre dei valori +/- SEM; n=3. \*=P<0.05).

### **Attivazione dei fattori di trascrizione AP2 $\alpha$ e NF-kB in funzione dei livelli proteici della PKC $\epsilon$ e della PLC $\gamma$ 1, in cellule C2C12 indotte al differenziamento miogenico**

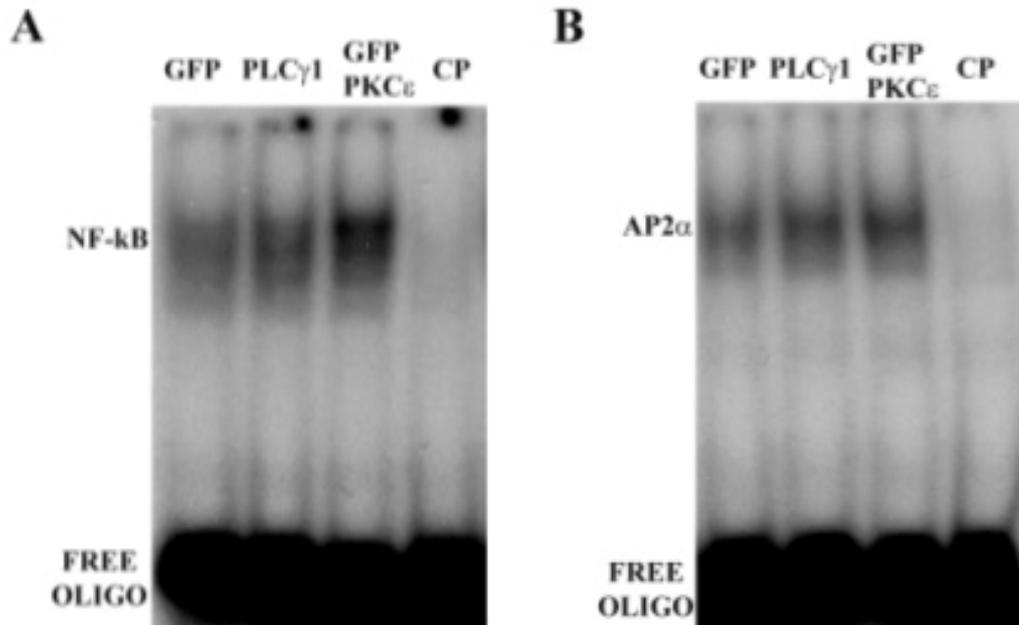
Una volta stabilito che la PKC $\epsilon$  agisce sul promotore della ciclina D3, attivandolo, e che l'attivazione è mantenuta anche nel frammento -37, ci siamo preoccupati di valutare quali potessero essere i siti putativi dei fattori di trascrizione presenti nel frammento -37; per fare questo abbiamo utilizzato il programma ALIBABA che predice la presenza di siti di legame di vari fattori di trascrizione, utilizzando dati provenienti dal database TRANSFACT. Il risultato è stato che nel frammento -37 sono stati ritrovati siti di legame per il fattore di trascrizione SP1, AP2 $\alpha$  e NF-kB. (Figura 19).



**Figura 19. Potenziali siti di legame dei fattori di trascrizione nella regione -37 del promotore della ciclina D3.** Fattori di trascrizione elaborati dal programma ALIBABA.

Per valutare attraverso quale fattore di trascrizione la PLC $\gamma$ 1 e la PKC $\epsilon$  sono in grado di attivare la trascrizione del gene della ciclina D3, abbiamo modulato la loro espressione attraverso esperimenti di trasfezione cellulare e poi siamo andati a valutare l'attività di quei fattori di trascrizione che avevano il sito specifico di legame nel frammento-37 del promotore della ciclina D3. Attraverso la metodica EMSA è stato determinato lo stato di attivazione, e quindi la capacità di legame dei vari fattori di trascrizione che sono stati proposti dal programma ALIBABA. Come campioni sono state utilizzate cellule C2C12 indotte al differenziamento per 24 ore, dopo 48 ore totale di trasfezione con i vettori di espressione per la PLC $\gamma$ 1, la PKC $\epsilon$  e come controllo è stato utilizzato il vettore di espressione codificante la proteina GFP. Il risultato, confrontato con il dato ottenuto dalla sola iperespressione della GFP, è stato che sia la PLC $\gamma$ 1 sia la PKC $\epsilon$  contribuiscono ad aumentare l'affinità di legame del fattore di trascrizione AP2 $\alpha$  nei confronti dei loro specifici oligonucleotidi (Figura 20A). Per quanto riguarda invece il fattore di trascrizione NF-kB, si è dimostrata più efficace la iperespressione della PKC $\epsilon$ , nell'incrementare la capacità di legame del fattore di trascrizione in esame, rispetto a quella ottenuta dalla iperespressione della PLC $\gamma$ 1 (Figura 20B). SP1 non ha mostrato significative variazioni della propria capacità di legame con oligonucleotidi

specifici, tra il controllo GFP e la iperespressione delle proteine in esame, PLC $\gamma$ 1 e PKC $\epsilon$  (dati non mostrati).



**Figura 20. Effetto della iperespressione della PLC $\gamma$ 1 e della PKC $\epsilon$  sulla modulazione dei potenziali fattori di trascrizione presenti nella regione -37 del promotore della ciclina D3, in C2C12 indotte al differenziamento.** A: attivazione del fattore di trascrizione NF-kB in seguito a 48 ore di iperespressione della PKC $\epsilon$  della PLC $\gamma$ 1, di cui 24 in condizioni di differenziamento. B: attivazione del fattore di trascrizione AP2 $\alpha$  in seguito a 48 ore di iperespressione della PKC $\epsilon$  della PLC $\gamma$ 1, di cui 24 in condizioni di differenziamento. In entrambi i saggi EMSA il campione GFP viene usato come riferimento. Inoltre come si può notare la sonda libera (free oligo) e il controllo della specificità del legame alla sonda in cui al campione è stata aggiunta una quantità di sonda fredda 100 volte superiore a quella marcata (CP).

# DISCUSSIONE

Durante il dottorato di ricerca mi sono occupato di studiare il coinvolgimento della PKC $\epsilon$  e della PLC $\gamma$ 1 nel differenziamento del muscolo scheletrico. In particolare è stato messo in evidenza che entrambe le proteine, la PKC $\epsilon$  e la PLC $\gamma$ 1, sono determinanti nell' induzione della trascrizione del gene della ciclina D3 durante il differenziamento miogenico indotto da insulina. Il differenziamento del muscolo scheletrico inizia con i mioblasti proliferanti escono dal ciclo cellulare e vanno incontro a cambiamenti morfologici e biochimici, quali l'allineamento, l'allungamento e la fusione dei mioblasti mononucleati in miotubi polinucleati. Durante il differenziamento vengono espresse proteine specifiche, considerate marcatori del differenziamento miogenico, quali la miogenina e i membri della famiglia MEF2, che cooperano nell'attivazione di vari geni strutturali del muscolo scheletrico [138]. L'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti è determinante ai fini del differenziamento miogenico; proteine come MyoD sono coinvolte nell'arresto del ciclo cellulare, mediante l'induzione di repressori del ciclo cellulare come pRb e la chinasi p21 [149, 150]; inoltre, MyoD attiva l'espressione della ciclina D3. Recentemente è stato dimostrato che la ciclina D3 ha un ruolo fondamentale nel mantenimento dello stato differenziativo delle C2C12. Il meccanismo descritto prevede il sequestro di proteine indispensabili per il proseguo del ciclo cellulare, come PCNA, CDK4 e pRb, da parte della ciclina D3 [141]. Sperimentalmente, il differenziamento miogenico può essere indotto tramite somministrazione di insulina o IGF-1 [151]. Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che in cellule C2C12, indotte al differenziamento con insulina, l'espressione della PLC $\beta$ 1 e della PLC $\gamma$ 1 aumenta e che entrambe le proteine regolano l'espressione della ciclina D3 [142]. Inoltre è stato dimostrato che questa modulazione da parte della PLC $\beta$ 1 e della PLC $\gamma$ 1 avviene tramite due compartimenti diversi, nucleare per la PLC $\beta$ 1 e citoplasmatica per la PLC $\gamma$ 1, e che ciascuna fosfolipasi è in grado di attivare zone specifiche del promotore della ciclina D3. Numerosi studi hanno evidenziato che la PKC $\epsilon$  e la PLC $\gamma$ 1 fanno parte della stessa via di trasduzione di segnale. In particolare, durante il processo di fagocitosi è stato visto che sia la PKC $\epsilon$  sia la PLC $\gamma$ 1 localizzano a livello del fagosoma, dove la PLC $\gamma$ 1 viene reclutata attraverso il suo dominio SH2: in seguito ad attivazione mediante fosforilazione, i residui tirosinici favorirebbero la produzione di DAG che a sua volta richiamerebbe la PKC $\epsilon$  attraverso il suo dominio C1B [152, 153]. Inoltre, è stato dimostrato come il fattore di crescita EGF porti all'attivazione della PLC $\gamma$ 1 attraverso la PKC $\epsilon$  la quale media la formazione del complesso tra la PLC $\gamma$ 1 e il recettore EGFR, favorendo la fosforilazione dei residui tirosinici della PLC $\gamma$ 1 e quindi la sua attivazione [145]. In cardiomiociti trattati con perossido di idrogeno la PLC $\gamma$ 1 attraverso la PKC $\epsilon$ , medierebbe la fosforilazione di Bcl-2 con conseguente inibizione del processo apoptotico [143]. Oltre ad avere come partner di trasduzione del segnale la PLC $\gamma$ 1, la

PKC $\epsilon$  viene attivata e indotta alla traslocazione in seguito a stimolazione di insulina, in numerosi sistemi cellulari come in miociti BC3H-1, in adipociti di ratto, in cellule muscolari di ratto L6 e anche in fibroblasti di ratto trasfettati con il recettore dell'insulina HIRC-B [146, 154, 155].

In questo studio abbiamo messo in evidenza che la PKC $\epsilon$  non solo è espressa in cellule C2C12, ma che la sua espressione aumenta durante il differenziamento muscolare. Inoltre, abbiamo dimostrato che anche l'attività catalitica della PKC $\epsilon$  aumenta durante il differenziamento miogenico, e che questa attivazione risulta indipendente dalla presenza di attivatori lipidici nel saggio d'attività. Questo potrebbe fare pensare ad un'attivazione enzimatica mediata da tirosine chinasi, residui importanti nell'attivazione enzimatica delle PKC, indipendentemente dalla presenza di attivatori lipidici [156, 157]. Quindi, la fosforilazione della PKC $\epsilon$  su residui tirosinici da parte di tirosine chinasi, che potrebbero non essere necessariamente di tipo recettoriale, potrebbe spiegare l'incremento dell'attività catalitica della PKC $\epsilon$ . Inoltre, incrementi dell'attività enzimatica della PKC $\epsilon$  sono stati collegati alla fosforilazione di bersagli antiapoptotici come Bcl-2, in cui è coinvolta anche la PLC $\gamma$ 1 [143]. Pertanto la PKC $\epsilon$  potrebbe avere un ruolo nel prevenire la morte cellulare. È interessante notare come la fosforilazione di residui tirosinici della PKC $\epsilon$  da parte di tirosine chinasi di tipo recettoriale non porta all'incremento dell'attività catalitica [145], che invece si verifica in seguito alla fosforilazione da parte di tirosine chinasi di tipo non recettoriale.

Abbiamo poi evidenziato la presenza di un complesso proteico formato dalla PKC $\epsilon$  e dalla PLC $\gamma$ 1. Inoltre, durante il differenziamento muscolare questo complesso colocalizza con una proteina tipica del compartimento perinucleare corrispondente al Golgi. Andando avanti con questa ricerca abbiamo mostrato che sono i domini SH presenti nella sequenza proteica della PLC $\gamma$ 1 ad essere responsabile della formazione del complesso con la PKC $\epsilon$ . In particolare abbiamo dimostrato che la formazione di questo complesso è mediato dal dominio SH3 durante la fase di crescita delle cellule, mentre durante la fase di differenziamento il complesso è mediato dal dominio SH2SH2. La partecipazione alla formazione di un complesso tra PLC $\gamma$ 1 e PKC $\epsilon$  mediata dal dominio C-SH2, è stato dimostrato essere mediato dal residuo tirosinico in posizione 573 della PKC $\epsilon$ , in seguito a fosforilazione da parte di tirosine chinasi di tipo recettoriale [145]. Il dominio SH3 della PLC $\gamma$ 1, invece, appare essere coinvolto nella formazione del complesso con la PLC $\gamma$ 1 in cellule ciclianti e un potenziale motivo di residui prolifici, che è presente nel dominio V5 della PKC $\epsilon$ . Uno studio ha evidenziato che la regione V5 della PKC $\epsilon$  è fondamentale nella localizzazione e nella traslocazione della proteina in membrana, in seguito a stimolo di esteri del forbolo [158]. Ulteriori studi di mutagenesi potranno chiarire meglio la specificità dell'interazione tra PKC $\epsilon$  e il dominio SH3.

Oltre al dominio C1 della PKC $\epsilon$  anche il residuo serinico 729 fosforilato è correlato alla localizzazione perinucleare della proteina in corrispondenza del Golgi [148, 159], e inoltre è funzione dell'attività catalitica della PKC $\epsilon$  stessa [160, 161]. Quindi per avere ulteriori informazioni su quale potesse essere il compartimento sede della formazione del complesso, siamo andati a valutare la fosforilazione del residuo serinico 729 della PKC $\epsilon$ , che infatti aumenta durante il differenziamento miogenico. Un'ulteriore conferma della localizzazione a livello del Golgi del complesso PLC $\gamma$ 1-PKC $\epsilon$  è stata ottenuta attraverso esperimenti di co-localizzazione con la proteina Golgi 58K, specifico marcatore di questo compartimento cellulare.

Per stabilire infine se la PKC $\epsilon$  avesse un ruolo come molecola segnale nella regolazione della trascrizione del gene della ciclina D3 da parte della PLC $\gamma$ 1, abbiamo modulato la sua espressione attraverso esperimenti di amplificazione e silenziamento. Effettivamente tutti i risultati ottenuti indicano che una variazione di espressione o di attività della PKC $\epsilon$  porta ad una modulazione dell'espressione della ciclina D3. Abbiamo dimostrato che la PKC $\epsilon$  e la PLC $\gamma$ 1 in questo modello sperimentale hanno un unico target: la regolazione dell'espressione della ciclina D3. Infatti, la PKC $\epsilon$  è in grado di modulare l'attivazione del promotore della ciclina D3 nella regione -37 allo stesso modo in cui modula l'intera lunghezza del promotore stesso. Abbiamo altresì dimostrato che la PLC $\gamma$ 1 e la PKC $\epsilon$  modulano la trascrizione del gene della ciclina D3 attraverso l'attivazione di due fattori di trascrizione, AP2 $\alpha$  e NF $\kappa$ B che presentano il loro specifico sito di legame esattamente nel frammento -37 del promotore della ciclina D3.

L'analisi dell'attivazione di questi fattori di trascrizione, misurata in base alla loro capacità di legarsi a specifici substrati mediante la metodica EMSA, ha mostrato che AP2 $\alpha$  e NF- $\kappa$ B vengono attivati sia dalla PKC $\epsilon$ , sia dalla PLC $\gamma$ 1; in particolare nell'attivazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B si è dimostrata più efficace l'azione della PKC $\epsilon$ . Diversi studi hanno messo in evidenza come nella regolazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B possa essere coinvolta la PKC $\epsilon$  [162, 163], e come il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B sia al centro di una controversia ancora non bene chiarita, riguardo al suo ruolo nel differenziamento miogenico [164, 165]. Il fattore di trascrizione AP2 $\alpha$ , invece, è stato dimostrato essere coinvolto nella regolazione genica basale della proteina citoscheletrica A-utrofina, in cellule C2C12 [166].

In conclusione risulta chiaro il ruolo determinante della PKC $\epsilon$  nella regolazione della ciclina D3 durante il differenziamento muscolare di cellule C2C12 indotto da insulina. In particolare noi evidenziamo che la PKC $\epsilon$ , assieme alla PLC $\gamma$ 1, oltre ad avere come bersaglio comune la ciclina D3 partecipano alla formazione di un complesso che vede coinvolto il dominio SH2SH2 della PLC $\gamma$ 1 e che tale complesso appare localizzarsi a livello della regione del Golgi. Inoltre, abbiamo dimostrato

che la regolazione dell'espressione della ciclina D3 è controllata dall'attività dei fattori di trascrizione AP2 $\alpha$  ed NF-kB che agiscono a livello dei loro siti specifici di legame nella regione – 37 del promotore della ciclina D3.

# **BIBLIOGRAFIA**

1. Whiteside, S.T. and S. Goodbourn, *Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation*. J Cell Sci, 1993. **104 ( Pt 4)**: p. 949-55.
2. Schnabel, P. and M. Camps, *Activation of a phospholipase C $\beta$ 2 deletion mutant by limited proteolysis*. Biochem J, 1998. **330 ( Pt 1)**: p. 461-8.
3. Payraastre, B., et al., *Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space*. Cell Signal, 2001. **13(6)**: p. 377-87.
4. Karin, M., *Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease*. Faseb J, 1992. **6(8)**: p. 2581-90.
5. Martin, T.F., *Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 231-64.
6. Gerasimenko, O.V., et al., *ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope*. Cell, 1995. **80(3)**: p. 439-44.
7. Divecha, N. and R.F. Irvine, *Phospholipid signaling*. Cell, 1995. **80(2)**: p. 269-78.
8. Rhee, S.G., *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 281-312.
9. Cocco, L., et al., *Inositides and the nucleus: phospholipase C $\beta$  family localization and signaling activity*. Adv Enzyme Regul, 2000. **40**: p. 83-95.
10. Rebecchi, M.J. and S.N. Pentylala, *Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Physiol Rev, 2000. **80(4)**: p. 1291-335.
11. Cocco, L., et al., *Significance of subnuclear localization of key players of inositol lipid cycle*. Adv Enzyme Regul, 2004. **44**: p. 51-60.
12. Martelli, A.M., et al., *Nuclear lipids: new functions for old molecules?* J Cell Biochem, 2003. **88(3)**: p. 455-61.
13. Pettitt, T.R., et al., *Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272(28)**: p. 17354-9.
14. Ron, D. and M.G. Kazanietz, *New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors*. Faseb J, 1999. **13(13)**: p. 1658-76.
15. Stewart, A.J., et al., *Phospholipase C- $\eta$  enzymes as putative protein kinase C and Ca<sup>2+</sup> signalling components in neuronal and neuroendocrine tissues*. Neuroendocrinology, 2007. **86(4)**: p. 243-8.
16. Saunders, C.M., et al., *PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development*. Development, 2002. **129(15)**: p. 3533-44.
17. Divecha, N., et al., *Nuclear inositides: inconsistent consistencies*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57(3)**: p. 379-93.
18. Jezyk, M.R., et al., *Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C- $\beta$ 2*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13(12)**: p. 1135-40.
19. Rhee, S.G. and Y.S. Bae, *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes*. J Biol Chem, 1997. **272(24)**: p. 15045-8.
20. Rhee, S.G., et al., *Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C*. Science, 1989. **244(4904)**: p. 546-50.
21. Harlan, J.E., et al., *Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*. Nature, 1994. **371(6493)**: p. 168-70.

22. Rameh, L.E. and L.C. Cantley, *The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8347-50.
23. Essen, L.O., et al., *Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 595-602.
24. Hwang, J.I., et al., *Regulation of phospholipase C-beta 3 activity by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 2*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16632-7.
25. Suh, P.G., et al., *The roles of PDZ-containing proteins in PLC-beta-mediated signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(1): p. 1-7.
26. Tang, Y., et al., *Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37559-64.
27. Berstein, G., et al., *Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator*. Cell, 1992. **70**(3): p. 411-8.
28. Blank, J.L., A.H. Ross, and J.H. Exton, *Purification and characterization of two G-proteins that activate the beta 1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. Identification as members of the Gq class*. J Biol Chem, 1991. **266**(27): p. 18206-16.
29. Kim, C.G., D. Park, and S.G. Rhee, *The role of carboxyl-terminal basic amino acids in Gqalpha-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-beta1*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21187-92.
30. Paulssen, R.H., et al., *Carboxyl-terminal fragments of phospholipase C-beta1 with intrinsic Gq GTPase-activating protein (GAP) activity*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26622-9.
31. Bunney, T.D. and M. Katan, *Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(12): p. 640-8.
32. Lopez, I., et al., *A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2758-65.
33. Song, C., et al., *Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2752-7.
34. Bahk, Y.Y., et al., *Two forms of phospholipase C-beta 1 generated by alternative splicing*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8240-5.
35. Kim, M.J., et al., *A cytosolic, galphaq- and betagamma-insensitive splice variant of phospholipase C-beta4*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3618-24.
36. Takeuchi, H., et al., *Inhibition of Ca(2+) signalling by p130, a phospholipase-C-related catalytically inactive protein: critical role of the p130 pleckstrin homology domain*. Biochem J, 2000. **349**(Pt 1): p. 357-68.
37. Ferguson, K.M., et al., *Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain*. Cell, 1995. **83**(6): p. 1037-46.
38. Katan, M., *Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1436**(1-2): p. 5-17.
39. Cifuentes, M.E., L. Honkanen, and M.J. Rebecchi, *Proteolytic fragments of phosphoinositide-specific phospholipase C-delta 1. Catalytic and membrane binding properties*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11586-93.
40. Zhang, W. and E.J. Neer, *Reassembly of phospholipase C-beta2 from separated domains: analysis of basal and G protein-stimulated activities*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2503-8.
41. Razzini, G., et al., *The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta(1)*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 14873-81.
42. Wang, T., et al., *Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C-beta 1, C-beta 2, and C-delta 1 with lipid bilayers and the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins*. Biochemistry, 1999. **38**(5): p. 1517-24.
43. Snyder, J.T., et al., *The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta2 as an effector site for Rac*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 21099-104.

44. Ellis, M.V., et al., *Catalytic domain of phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC). Mutational analysis of residues within the active site and hydrophobic ridge of plcdelta1*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11650-9.
45. Lomasney, J.W., et al., *Activation of phospholipase C delta1 through C2 domain by a Ca(2+)-enzyme-phosphatidylserine ternary complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21995-2001.
46. Wang, T., et al., *Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and -beta2 with activated Galphaq subunits: an alternative function for C2-signaling modules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7843-6.
47. Guo, Y., F. Philip, and S. Scarlata, *The Pleckstrin homology domains of phospholipases C-beta and -delta confer activation through a common site*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29995-30004.
48. Singer, A.U., et al., *A unique fold of phospholipase C-beta mediates dimerization and interaction with G alpha q*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(1): p. 32-6.
49. Yamamoto, T., et al., *Involvement of EF hand motifs in the Ca(2+)-dependent binding of the pleckstrin homology domain to phosphoinositides*. Eur J Biochem, 1999. **265**(1): p. 481-90.
50. Homma, Y., et al., *Tissue- and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **164**(1): p. 406-12.
51. Rhee, S.G., *Inositol phospholipids-specific phospholipase C: interaction of the gamma 1 isoform with tyrosine kinase*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(8): p. 297-301.
52. Emori, Y., et al., *A second type of rat phosphoinositide-specific phospholipase C containing a src-related sequence not essential for phosphoinositide-hydrolyzing activity*. J Biol Chem, 1989. **264**(36): p. 21885-90.
53. Gerfen, C.R., et al., *Phospholipase C I and II brain isozymes: immunohistochemical localization in neuronal systems in rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(9): p. 3208-12.
54. Ross, C.A., et al., *Brain phospholipase C isozymes: differential mRNA localizations by in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2923-7.
55. Tanaka, O. and H. Kondo, *Localization of mRNAs for three novel members (beta 3, beta 4 and gamma 2) of phospholipase C family in mature rat brain*. Neurosci Lett, 1994. **182**(1): p. 17-20.
56. Lee, S.J., et al., *The promoter activity of the phospholipase C-gamma2 gene is regulated by a cell-type-specific control element*. DNA Cell Biol, 1997. **16**(4): p. 485-92.
57. Lee, S.J., et al., *Transcriptional regulation of phospholipase C-gamma 1 gene during muscle differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 194-200.
58. Noh, D.Y., et al., *Elevated content of phospholipase C-gamma 1 in colorectal cancer tissues*. Cancer, 1994. **73**(1): p. 36-41.
59. Bertagnolo, V., et al., *Intranuclear translocation of phospholipase C beta2 during HL-60 myeloid differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(3): p. 831-7.
60. Noh, D.Y., S.H. Shin, and S.G. Rhee, *Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1242**(2): p. 99-113.
61. Herbst, R., et al., *Formation of signal transfer complexes between stem cell and platelet-derived growth factor receptors and SH2 domain proteins in vitro*. Biochemistry, 1995. **34**(17): p. 5971-9.
62. Ponzetto, C., et al., *A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family*. Cell, 1994. **77**(2): p. 261-71.
63. Claesson-Welsh, L., *Platelet-derived growth factor receptor signals*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32023-6.

64. Mohammadi, M., et al., *A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 5068-78.
65. Obermeier, A., et al., *Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction*. Embo J, 1993. **12**(3): p. 933-41.
66. Vega, Q.C., et al., *A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(1): p. 128-35.
67. Soler, C., L. Beguinot, and G. Carpenter, *Individual epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites do not stringently define association motifs for several SH2-containing proteins*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 12320-4.
68. Poulin, B., F. Sekiya, and S.G. Rhee, *Differential roles of the Src homology 2 domains of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) in platelet-derived growth factor-induced activation of PLC-gamma1 in intact cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6411-6.
69. Ji, Q.S., et al., *Physiological requirement for both SH2 domains for phospholipase C-gamma1 function and interaction with platelet-derived growth factor receptors*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4961-70.
70. Kim, J.W., et al., *Tyrosine residues in bovine phospholipase C-gamma phosphorylated by the epidermal growth factor receptor in vitro*. J Biol Chem, 1990. **265**(7): p. 3940-3.
71. Wahl, M.I., et al., *Identification of two epidermal growth factor-sensitive tyrosine phosphorylation sites of phospholipase C-gamma in intact HSC-1 cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(7): p. 3944-8.
72. Kim, H.K., et al., *PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254*. Cell, 1991. **65**(3): p. 435-41.
73. Valius, M., C. Bazenet, and A. Kazlauskas, *Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor beta subunit and are required for binding of phospholipase C gamma and a 64-kilodalton protein, respectively*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(1): p. 133-43.
74. Mohammadi, M., et al., *Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis*. Nature, 1992. **358**(6388): p. 681-4.
75. Middlemas, D.S., J. Meisenhelder, and T. Hunter, *Identification of TrkB autophosphorylation sites and evidence that phospholipase C-gamma 1 is a substrate of the TrkB receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 5458-66.
76. Sawano, A., et al., *The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(2): p. 487-91.
77. Durick, K., et al., *Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12691-4.
78. Denu, J.M. and K.G. Tanner, *Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation*. Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5633-42.
79. Bae, Y.S., et al., *Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 217-21.
80. Wahl, M.I., et al., *Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(5): p. 1568-72.
81. Kim, U.H., et al., *Nerve growth factor stimulates phosphorylation of phospholipase C-gamma in PC12 cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(3): p. 1359-62.

82. Park, D.J., H.K. Min, and S.G. Rhee, *Inhibition of CD3-linked phospholipase C by phorbol ester and by cAMP is associated with decreased phosphotyrosine and increased phosphoserine contents of PLC-gamma 1*. J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1496-501.
83. Huckle, W.R., et al., *Protein kinase C inhibits epidermal growth factor-dependent tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma and activation of phosphoinositide hydrolysis*. Endocrinology, 1990. **127**(4): p. 1697-705.
84. Decker, S.J., et al., *Effects of substitution of threonine 654 of the epidermal growth factor receptor on epidermal growth factor-mediated activation of phospholipase C*. J Biol Chem, 1990. **265**(12): p. 7009-15.
85. Hasegawa-Sasaki, H., F. Lutz, and T. Sasaki, *Pathway of phospholipase C activation initiated with platelet-derived growth factor is different from that initiated with vasopressin and bombesin*. J Biol Chem, 1988. **263**(26): p. 12970-6.
86. Park, D.J., H.K. Min, and S.G. Rhee, *IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in rat basophilic leukemia cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24237-40.
87. Park, D.J., H.W. Rho, and S.G. Rhee, *CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 on serine and tyrosine residues in a human T-cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5453-6.
88. Rhee, S.G., et al., *Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation*. Biochem Soc Trans, 1991. **19**(2): p. 337-41.
89. Goldschmidt-Clermont, P.J., et al., *Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation*. Science, 1991. **251**(4998): p. 1231-3.
90. Sohn, R.H., et al., *Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21114-20.
91. Gilmore, A.P. and K. Burridge, *Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate*. Nature, 1996. **381**(6582): p. 531-5.
92. Fukami, K., et al., *alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1518-22.
93. Sun, H.Q., et al., *Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation*. J Cell Biol, 1995. **129**(1): p. 147-56.
94. Wahl, M.I., et al., *Growth factor stimulation of phospholipase C-gamma 1 activity. Comparative properties of control and activated enzymes*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10447-56.
95. Rameh, L.E., et al., *Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase C-gamma-mediated calcium signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23750-7.
96. Falasca, M., et al., *Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting*. Embo J, 1998. **17**(2): p. 414-22.
97. Bae, Y.S., et al., *Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4465-9.
98. Inoue, M., et al., *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain*. J Biol Chem, 1977. **252**(21): p. 7610-6.
99. Takai, Y., et al., *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum*. J Biol Chem, 1977. **252**(21): p. 7603-9.
100. Alkon, D.L., *Memory storage and neural systems*. Sci Am, 1989. **261**(1): p. 42-50.
101. Cutler, R.E., Jr., et al., *Regulation of delta protein kinase C during rat ovarian differentiation*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1179**(3): p. 260-70.
102. Murray, N.R., et al., *Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15847-53.

103. Ashendel, C.L., *The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase*. Biochim Biophys Acta, 1985. **822**(2): p. 219-42.
104. Nishizuka, Y., *Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses*. Faseb J, 1995. **9**(7): p. 484-96.
105. Tan, S.L. and P.J. Parker, *Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 3): p. 545-52.
106. Mochly-Rosen, D., *Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction*. Science, 1995. **268**(5208): p. 247-51.
107. Racke, F.K., et al., *A potential role for protein kinase C-epsilon in regulating megakaryocytic lineage commitment*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 522-8.
108. Lester, D.S., et al., *Lipid dependence of surface conformations of protein kinase C*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1039**(1): p. 33-41.
109. Zidovetzki, R. and D.S. Lester, *The mechanism of activation of protein kinase C: a biophysical perspective*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1134**(3): p. 261-72.
110. Nishizuka, Y., *The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation*. Nature, 1988. **334**(6184): p. 661-5.
111. Mosior, M. and S. McLaughlin, *Peptides that mimic the pseudosubstrate region of protein kinase C bind to acidic lipids in membranes*. Biophys J, 1991. **60**(1): p. 149-59.
112. Chauhan, V.P., et al., *Lipid activators of protein kinase C*. Life Sci, 1990. **47**(12): p. 981-6.
113. Allen, B.G., J.E. Andrea, and M.P. Walsh, *Identification and characterization of protein kinase C zeta-immunoreactive proteins*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 29288-98.
114. Palumbo, E.J., et al., *Oxidation-induced persistent activation of protein kinase C in hippocampal homogenates*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(3): p. 1439-45.
115. Newton, A.C. and D.E. Koshland, Jr., *Phosphatidylserine affects specificity of protein kinase C substrate phosphorylation and autophosphorylation*. Biochemistry, 1990. **29**(28): p. 6656-61.
116. Bornancin, F. and P.J. Parker, *Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase Calpha*. Curr Biol, 1996. **6**(9): p. 1114-23.
117. Bornancin, F. and P.J. Parker, *Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3544-9.
118. Kishimoto, A., et al., *Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease*. J Biol Chem, 1983. **258**(2): p. 1156-64.
119. Michetti, M., et al., *Reversible inactivation of calpain isoforms by nitric oxide*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(3): p. 1009-14.
120. Eto, A., et al., *The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, in rat pituitary GH4C1 cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 25115-20.
121. Rechsteiner, M. and S.W. Rogers, *PEST sequences and regulation by proteolysis*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(7): p. 267-71.
122. Lee, H.W., et al., *Bryostatins 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts*. Mol Pharmacol, 1997. **51**(3): p. 439-47.
123. Balciunaite, E., et al., *PDGF initiates two distinct phases of protein kinase C activity that make unequal contributions to the G0 to S transition*. Curr Biol, 2000. **10**(5): p. 261-7.
124. Jobbagy, Z., et al., *Up-regulation of the Pit-2 phosphate transporter/retrovirus receptor by protein kinase C epsilon*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7067-71.
125. Ali, I. and S.K. Sarna, *Selective modulation of PKC isozymes by inflammation in canine colonic circular muscle cells*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 483-94.

126. Mehta, K.D., et al., *Critical role of diacylglycerol- and phospholipid-regulated protein kinase C epsilon in induction of low-density lipoprotein receptor transcription in response to depletion of cholesterol.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3783-93.
127. DeCoy, D.L., J.R. Snapper, and M.D. Breyer, *Anti sense DNA down-regulates protein kinase C-epsilon and enhances vasopressin-stimulated Na<sup>+</sup> absorption in rabbit cortical collecting duct.* J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2749-56.
128. Akita, Y., et al., *Overproduction of a Ca(2+)-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH4C1 cells.* J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4653-60.
129. Song, J.C., et al., *PKC-epsilon regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS.* Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. C1239-49.
130. Akita, Y., *Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function.* J Biochem, 2002. **132**(6): p. 847-52.
131. Moriya, S., et al., *Platelet-derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3-kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 151-5.
132. Graness, A., et al., *A novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase C epsilon.* J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 32016-22.
133. Shirai, Y., et al., *Distinct effects of fatty acids on translocation of gamma- and epsilon-subspecies of protein kinase C.* J Cell Biol, 1998. **143**(2): p. 511-21.
134. Dorn, G.W., 2nd and D. Mochly-Rosen, *Intracellular transport mechanisms of signal transducers.* Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 407-29.
135. Prekeris, R., et al., *Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function.* J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 77-90.
136. Zeidman, R., et al., *Protein kinase C epsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 12-24.
137. Lehel, C., et al., *Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes.* J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19651-8.
138. Lassar, A.B., S.X. Skapek, and B. Novitch, *Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal.* Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(6): p. 788-94.
139. Puri, P.L. and V. Sartorelli, *Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications.* J Cell Physiol, 2000. **185**(2): p. 155-73.
140. Farah, C.S. and F.C. Reinach, *The troponin complex and regulation of muscle contraction.* Faseb J, 1995. **9**(9): p. 755-67.
141. Cenciarelli, C., et al., *Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 5203-17.
142. Faenza, I., et al., *Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter.* Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1108-17.
143. Mangat, R., et al., *Inhibition of phospholipase C-gamma 1 augments the decrease in cardiomyocyte viability by H2O2.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H854-60.
144. Zheng, L., et al., *Role of protein kinase C isozymes in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of Staphylococcus aureus by human monocytes.* J Immunol, 1995. **155**(2): p. 776-84.

145. Valkova, C., et al., *Protein kinase Cepsilon may act as EGF-inducible scaffold protein for phospholipase Cgamma1*. Cell Signal, 2007. **19**(9): p. 1830-43.
146. Yamada, K., et al., *Effects of insulin on the translocation of protein kinase C-theta and other protein kinase C isoforms in rat skeletal muscles*. Biochem J, 1995. **308 ( Pt 1)**: p. 177-80.
147. Standaert, M.L., et al., *Insulin translocates PKC-epsilon and phorbol esters induce and persistently translocate PKC-beta 2 in BC3H-1 myocytes*. Cell Signal, 1996. **8**(4): p. 313-6.
148. Xu, T.R., et al., *Phosphorylation at Ser729 specifies a Golgi localisation for protein kinase C epsilon (PKCepsilon) in 3T3 fibroblasts*. Cell Signal, 2007. **19**(9): p. 1986-95.
149. Halevy, O., et al., *Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD*. Science, 1995. **267**(5200): p. 1018-21.
150. Martelli, F., et al., *MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation*. Oncogene, 1994. **9**(12): p. 3579-90.
151. Coolican, S.A., et al., *The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6653-62.
152. Cheeseman, K.L., et al., *Targeting of protein kinase C-epsilon during Fcgamma receptor-dependent phagocytosis requires the epsilonC1B domain and phospholipase C-gamma1*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(2): p. 799-813.
153. Botelho, R.J., et al., *Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis*. J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1353-68.
154. Zhao, L., et al., *Effects of insulin on protein kinase-C (PKC) in HIRC-B cells: specific activation of PKC epsilon and its resistance to phorbol ester-induced down-regulation*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2504-10.
155. Farese, R.V., et al., *Effects of insulin and phorbol esters on subcellular distribution of protein kinase C isoforms in rat adipocytes*. Biochem J, 1992. **288 ( Pt 1)**: p. 319-23.
156. Konishi, H., et al., *Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H2O2-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6587-92.
157. Konishi, H., et al., *Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H2O2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11233-7.
158. Wang, Q.J., et al., *The V5 domain of protein kinase C plays a critical role in determining the isoform-specific localization, translocation, and biological function of protein kinase C-delta and -epsilon*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(2): p. 129-40.
159. England, K. and M.G. Rumsby, *Changes in protein kinase C epsilon phosphorylation status and intracellular localization as 3T3 and 3T6 fibroblasts grow to confluency and quiescence: a role for phosphorylation at ser-729?* Biochem J, 2000. **352 Pt 1**: p. 19-26.
160. Zhu, Y., et al., *The very C-terminus of protein kinase Cepsilon is critical for the full catalytic competence but its hydrophobic motif is dispensable for the interaction with 3-phosphoinositide-dependent kinase-1*. Cell Signal, 2006. **18**(6): p. 807-18.
161. Cenni, V., et al., *Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation*. Biochem J, 2002. **363**(Pt 3): p. 537-45.
162. Li, R.C., et al., *PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(4): p. H1679-89.
163. Salazar, R., R. Brandt, and S. Krantz, *Binding of Amadori glucose-modified albumin by the monocytic cell line MonoMac 6 activates protein kinase C epsilon protein tyrosine kinases and the transcription factors AP-1 and NF-kappaB*. Glycoconj J, 2001. **18**(10): p. 769-77.
164. Guttridge, D.C., et al., *NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5785-99.
165. Conejo, R., et al., *Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and downregulation of AP-1 activities*. J Cell Physiol, 2001. **186**(1): p. 82-94.

166. Perkins, K.J., E.A. Burton, and K.E. Davies, *The role of basal and myogenic factors in the transcriptional activation of utrophin promoter A: implications for therapeutic up-regulation in Duchenne muscular dystrophy*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(23): p. 4843-50.