

**Alma Mater Studiorum – Università degli Studi di  
Bologna**

---

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE  
MORFOLOGICHE UMANE E MOLECOLARI**

SETTORE DISCIPLINARE BIO/16

**STUDIO DELLA TRASDUZIONE  
DEL SEGNALE NUCLEARE  
INOSITIDE-DIPENDENTE:  
IDENTIFICAZIONE DI eEF1A2  
COME NUOVO FOSFOSUBSTRATO  
DI PKC  $\beta$ 1**

Presentata da: Dott.ssa Manuela Piazzì

**Coordinatore:**  
Chiar.mo Prof.  
Lucio Cocco

**Relatore:**  
Chiar.mo Prof.  
Lucio Cocco

---

Ciclo XXI  
**Esame finale anno 2009**

# Indice

<b>CAPITOLO 1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
1.1 TRASDUZIONE DEL SEGNALE INOSITIDE-DIPENDENTE .....	1
1.2 LE PROTEIN CHINASI C .....	13
1.3 IL DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO.....	20
1.4 IL FATTORE DI ELONGAZIONE EUCARIOTICA EEF1A2 .....	24
<b>CAPITOLO 2 SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	<b>34</b>
<b>CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>35</b>
3.1 REAGENTI E ANTICORPI.....	35
3.2 COLTURE CELLULARI INDUZIONE AL DIFFERENZIAMENTO .....	35
3.3 PURIFICAZIONE DI NUCLEI DA CELLULE C2C12 .....	36
3.4 PURIFICAZIONE DI NUCLEOLI DA CELLULE C2C12 .....	36
3.5 SOLUBILIZZAZIONE DELLE FRAZIONI CELLULARI E DOSAGGIO DEL CONTENUTO PROTEICO .....	37
3.6 IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	38
3.7 SDS-PAGE E ANALISI MEDIANTE IMMUNOBLOTTING.....	38
3.8 IMMUNOFLUORESCENZA SU PREPARATI NUCLEARI “IN SITU” .....	39
3.9 ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA LC-MS/MS .....	40
3.10 MUTAGENESI SITO-SPECIFICA ED ANALISI IMMUNOCHEMICA CON PROTEINE RICOMBINANTI GST-EEF1A2 E GST-EEF1A2/S53A.....	41
3.11 TRASFEZIONE TRANSIENTE CON IL VETTORE GFP-EEF1A2 .....	42
3.12 SILENZIAMENTO DELLA PI-PLC $\beta$ 1 CON OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSEN.....	42
<b>CAPITOLO 4 RISULTATI</b> .....	<b>43</b>
4.1 IMMUNOPRECIPITAZIONE CON ANTICORPO ANTI-FOSFOSUBSTRATO DI PKC CONVENZIONALI .....	43
4.2 IMMUNOBLOTTING: DISTRIBUZIONE INTRACELLULARE DI EEF1A2 .....	46
4.3 ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DI EEF1A2 CON INDAGINE IMMUNOCITOCHIMICA E TRASFEZIONE CON GFP.....	47

4.4 ANALISI IN IMMUNOBLOTTING DELLA DISTRIBUZIONE DELLE ISOFORME DI CPKC IN NUCLEI DI CELLULE C2C12 .....	51
4.5 ESPERIMENTI DI “PULL-DOWN” CON LE PROTEINE RICOMBINANTI GST-EEF1A2 E EEF1A2/S53A .....	53
4.6 ESPRESSIONE DEL FATTORE DI ELONGAZIONE EEF1A2 DURANTE IL PROCESSO DI DIFFERENZIAMENTO MIOGENICO.....	54
4.7 EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DELLA PI-PLC B1 SULL’ESPRESSIONE E FOSFORILAZIONE DEL FATTORE DI ELONGAZIONE EEF1A2 .....	56
<b>CAPITOLO 5 CONCLUSIONI.....</b>	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>60</b>

# Capitolo 1 Introduzione

## 1.1 Trasduzione del segnale inositide-dipendente

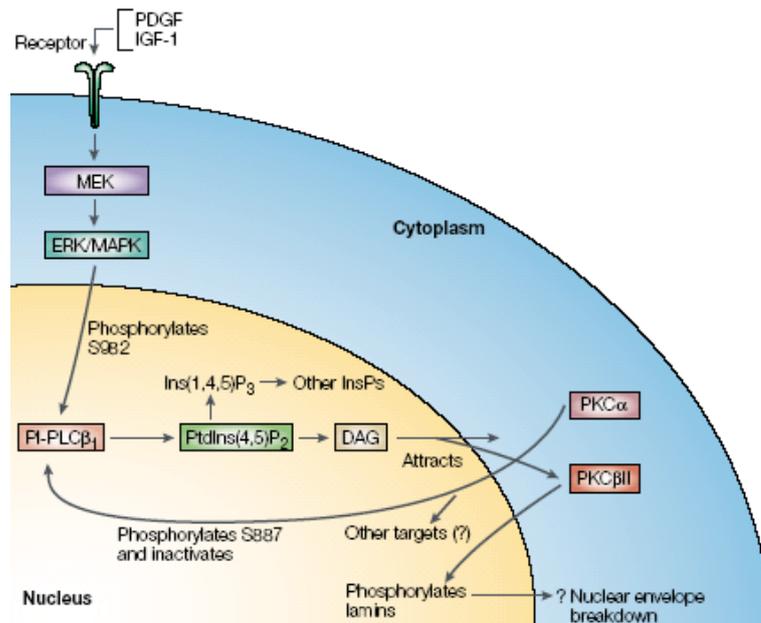
La capacità di ogni cellula di rispondere agli stimoli ambientali è dovuta all'attivazione di un processo di trasduzione del segnale. Questo processo prevede che, in seguito all'interazione di molecole presenti nello spazio extra-cellulare, denominate "ligandi", con i loro recettori presenti sulla superficie cellulare, vengano attivate all'interno della cellula una o più vie di risposta. In questo modo la cellula può integrare le numerose informazioni che riceve circa le variazioni dell'ambiente esterno generando così una risposta adeguata all'insieme dei segnali recepiti.

Una di queste vie di trasduzione del segnale prevede l'idrolisi di un fosfolipide di membrana, il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). Questa reazione è catalizzata dalle fosfolipasi C (PLC) fosfoinositide-specifiche e comporta la produzione di due importanti secondi messaggeri: l'inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) e il diacilglicerolo (DAG). L'IP<sub>3</sub> liberato si lega al suo recettore, presente a livello del reticolo endoplasmatico, causando così l'apertura dei canali del Ca<sup>2+</sup> con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di questo ione e l'attivazione degli enzimi Ca<sup>2+</sup>-dipendenti. Inoltre l'IP<sub>3</sub> può costituire il substrato di diverse chinasi e fosfatasi che generano a loro volta una serie di intermedi coinvolti anch'essi nel *signalling* intracellulare.

Il DAG va invece ad attivare alcune isoforme della proteina chinasi C (PKC), che a loro volta hanno come bersaglio specifiche cascate di trasduzione del segnale.

### 1.1.1 Il ciclo dei fosfoinositidi nel nucleo cellulare

Alla fine degli anni Ottanta cominciarono ad emergere le prime evidenze sulla presenza dei fosfoinositidi a livello nucleare, sebbene in minima percentuale, e del loro coinvolgimento in processi quali proliferazione e differenziamento cellulare.



**Figura 1 - Meccanismi di regolazione dell'attività della PLC-β1 nucleare**

Irvine, R. F. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 349-60 (2003)

La trasduzione del segnale legata ai fosfoinositidi si basa sulla sintesi e sul metabolismo del PIP<sub>2</sub>, molecola chiave in grado sia di modulare direttamente l'attività di altre proteine effettrici, che di essere a sua volta substrato di enzimi in grado di attivare una cascata di trasduzione del segnale.

In seguito all'attivazione di PI-PLC a livello nucleare, il PIP<sub>2</sub> viene idrolizzato in due molecole trasduttrici fondamentali, IP<sub>3</sub> e DAG, in grado di agire come secondi messaggeri all'interno del nucleo (Fig.1).

Il DAG, a livello nucleare, può essere fosforilato da un enzima finemente regolato, la DAG chinasi, producendo un altro importante secondo messaggero, l'acido fosfatidico (PA). Questo implica che, nel nucleo, DGK esercita una duplice funzione: determina l'inattivazione del segnale indotto dal DAG e genera PA. Sono state descritte nove isoforme di DGK, sei delle quali presenti a livello nucleare in diversi modelli cellulari (1).

L'IP<sub>3</sub> è un secondo messaggero idrofilico ed ha un ruolo nella regolazione nucleare del Ca<sup>2+</sup>. A livello citoplasmatico, IP<sub>3</sub> lega il suo specifico recettore e determina il rilascio delle riserve intracellulari di Ca<sup>2+</sup>, mentre a livello nucleare il ruolo di IP<sub>3</sub> rimane ancora

controverso (2, 3). È noto che sono presenti pompe ioniche per il  $\text{Ca}^{2+}$  nella membrana nucleare esterna e ci sono evidenze della presenza di recettori che legano  $\text{IP}_3$  a livello transmembrana, con il dominio che lega  $\text{IP}_3$  sporgente sul versante nucleoplasmatico.

È nota anche un'altra importante funzione di  $\text{IP}_3$  a livello nucleare, in quanto precursore di una serie di secondi messaggeri lipidici, gli inositoli "iperfosforilati", che sono stati recentemente correlati al rimodellamento della cromatina e all'esportazione degli mRNA nel citoplasma (4, 5).

Il  $\text{PIP}_2$  è un substrato non solo di PI-PLC, ma anche di altri importanti enzimi presenti a livello nucleare, quali la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K). In seguito alla fosforilazione di  $\text{PIP}_2$  da parte di PI3K si ha la produzione di  $\text{PIP}_3$ , ma questo enzima può anche generare  $\text{PI}(3)\text{P}$  e  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ . I membri della famiglia delle PI3K sono considerati oncogeni in quanto sono coinvolti nel controllo della progressione del ciclo cellulare, differenziamento, sopravvivenza cellulare, invasione, processo metastatico ed oncogenesi.

Molti degli effetti biologici associati all'attività di questi enzimi sono mediati da Akt, una serina/treonina chinasi presente nel nucleo (6).

$\text{PIP}_3$  può essere in seguito riconvertito a  $\text{PIP}_2$  dall'azione di PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), che può anche generare  $\text{PI}(4)\text{P}$  a partire da  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ . PTEN è mutato o inattivato in molti processi tumorali e questo comporta l'attivazione costitutiva della cascata di trasduzione del segnale indotta da PI3K.

Un altro gruppo di enzimi che esercita un ruolo molto importante nel ciclo nucleare dei fosfoinositidi, sono le chinasi che fosforilano il PI nelle posizioni 3, 4 e 5 dell'anello dell'inositolo. Questi residui fosforilati possono essere bersaglio di fosfatasi per completare il ciclo e aumentare il numero dei diversi isomeri fosfato del PI. Sono state descritte tre classi di PIPK: PIPKI, PIPKII e PIPKIII. Le prime due classi possono produrre  $\text{PIP}_2$ . PIPKI  $\alpha$  e PIPKII  $\beta$  sono state identificate a livello nucleare (7, 8).

### **1.1.2 Ruolo e regolazione del $\text{PIP}_2$ a livello nucleare**

All'inizio degli anni Ottanta è stato dimostrato che i lipidi che presentavano polarità negativa erano implicati nella decondensazione della cromatina, mentre quelli con carica positiva avevano un effetto opposto (9). Da allora, diversi studi hanno confermato l'idea che i fosfolipidi siano implicati nel rimodellamento e nella struttura della cromatina.

Per esempio, il PIP<sub>2</sub> è in grado di riconoscere ed interagire con il dominio C-terminale dell'istone H1: uno dei meccanismi proposti è che il legame del PIP<sub>2</sub> all'istone H1 ne determini il rilascio dal DNA attivando quindi la RNA polimerasi II. Il rilascio e la fosforilazione dell'istone H1 determinano la decondensazione delle fibre cromatiniche ed aumento dell'attività trascrizionale. È stato anche suggerito che il PIP<sub>2</sub> possa mantenere la cromatina in uno stato trascrizionalmente attivo agendo sulla fosforilazione dell'istone H1. Durante l'assemblaggio dei nucleosomi, l'acetilazione degli istoni regola il legame dell'istone H1 e la condensazione della cromatina (10, 11). Il rilascio dell'istone H1 è necessario per l'acetilazione dell'istone H3, quindi per avviare la trascrizione. Il complesso SKTL/ASH2 di rimodellamento della cromatina interagirebbe con la cromatina, dove PIP<sub>2</sub> può essere prodotto e può legare l'istone H1. Questa interazione può essere resa possibile dal fatto che ASH2 presenta un dominio PHD (*plant homeodomain*), in grado di interagire con i fosfoinositidi.

Questa interazione determinerebbe il rilascio dell'istone H1 e ne impedirebbe l'iperfosforilazione, il che porterebbe, nell'ordine, alla decondensazione della cromatina, all'acetilazione istonica e all'attivazione trascrizionale (12).

Un altro meccanismo proposto per spiegare come il PIP<sub>2</sub> possa modulare il rimodellamento della cromatina, coinvolge il complesso BAF. Questo complesso è presente a livello nucleare ed è associato alla matrice nucleare.

BAF presenta un *core* ATP-asico SWI/SNF2, contiene BRG-1 e altre 12 subunità, due delle quali sono la beta-actina e BAF53, una proteina associata all'actina (13). L'associazione di BAF alla matrice nucleare richiede la presenza di tutte e tre le subunità: beta-actina, BAF53 e BRG-1 (14). BRG-1 presenta due domini che legano l'actina, uno dei quali contiene una regione ricca in lisine necessaria per la funzione di BRG-1 e per il legame con il PIP<sub>2</sub> (15). Il meccanismo proposto prevede che il PIP<sub>2</sub> rompa il legame tra BRG-1 e l'actina, esponendo un sito dell'actina necessario per l'interazione con la matrice nucleare.

Un legame interessante è che la proteina Rb (*retinoblastoma protein*), che recluta il complesso BAF per la regolazione dell'espressione genica, interagisca e attivi la PIPK di tipo I (16). L'aumento quindi di PIP<sub>2</sub> potrebbe portare a una stretta associazione tra il complesso BAF e la matrice nucleare; inoltre, Jones e Divecha hanno proposto un meccanismo per cui BAF interagirebbe e sarebbe in grado di reclutare PIPK di tipo I per controllare la sintesi di PIP<sub>2</sub> (17).

### 1.1.3 PI-PLC

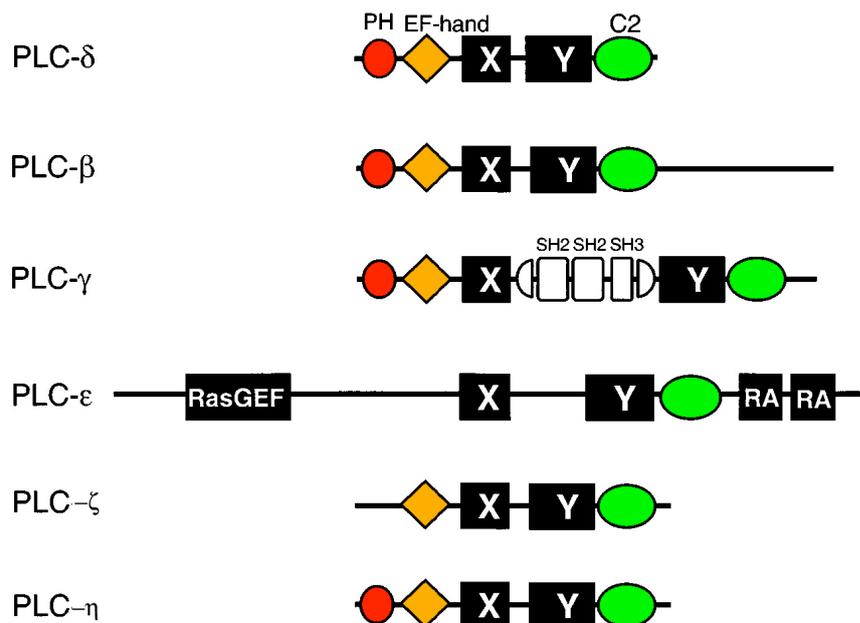
Fino ad oggi nei mammiferi sono state identificate almeno 13 isoforme di PLC, che vengono suddivise in sei famiglie:  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ,  $-\delta$ ,  $-\varepsilon$ ,  $-\zeta$  ed  $-\eta$ . Tutte queste isoforme differiscono nella loro organizzazione strutturale, nei meccanismi di regolazione e di attivazione e nella loro distribuzione tissutale (18).

Le PLC sono presenti a tutti i livelli evolutivi, partendo dalle più semplici fosfolipasi batteriche, che contengono solamente il sito catalitico e che necessitano di  $\text{Ca}^{2+}$  per la loro attività enzimatica, fino alle forme più complesse presenti negli eucarioti superiori, che si ritengono derivare da una PLC ancestrale (19). Il peso molecolare di questi enzimi varia dai 70-75 kilodalton (kDa) dell'isoforma  $\zeta$ (20), ai circa 85 kDa delle PLC- $\delta$ , ai 120-155 kDa delle isoforme  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\eta$ , per arrivare ai 230-260 kDa della PLC- $\varepsilon$ .

Dal punto di vista strutturale, il *core* catalitico di tutte le PLC è costituito dall'associazione tra i domini X ed Y. Il confronto delle sequenze aminoacidiche delle diverse isoforme di PLC ha rivelato che le sequenze primarie di questi enzimi sono scarsamente conservate, fatta eccezione per questi due domini (21, 22). Infatti le PLC presentano a livello dei domini X ed Y un'omologia di sequenza pari a circa il 60%, che risulta essere superiore tra i membri appartenenti alla stessa famiglia (Fig. 2).

La regione *linker*, compresa tra i domini X e Y, invece risulta essere molto variabile nelle diverse famiglie. Il *linker* delle isoforme  $\beta$  e  $\delta$  infatti è costituito da 40-110 amino acidi, mentre nell'isoforma  $\varepsilon$  è formato da 190 residui. Nelle PLC- $\gamma$  poi questa regione comprende circa 400 amino acidi organizzati in due domini SH2 (*Src Homology2*) e un dominio SH3 in grado di legare, rispettivamente, sequenze contenenti tirosine fosforilate e sequenze ricche in prolina.

Le isoforme delle famiglie  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ed  $\eta$  contengono tutte quante un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) nella regione N-terminale. Questo dominio comprende circa 100 aminoacidi ed è in grado di legarsi a diversi polifosfoinositidi. Questo modulo è presente in numerose proteine che partecipano alla trasduzione del segnale (23, 24). Lo studio della struttura tridimensionale di un mutante della PLC- $\delta$ 1 di ratto, privo del dominio PH, ha evidenziato l'esistenza di due ulteriori moduli: un dominio a mano EF, localizzato tra i domini PH e X, ed un dominio C2, che in alcuni isozimi costituisce un'estensione del dominio Y (25).



**Figura 2 - Organizzazione strutturale delle isoforme delle PLC.** Adattata da (19).

Entrambi questi domini sono presenti negli enzimi delle famiglie  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  ed  $\eta$ , mentre la PLC- $\epsilon$  presenta solo il dominio C2.

Come già ricordato, le varie famiglie presentano ognuna caratteristiche peculiari dal punto di vista strutturale. In particolare, le isoforme  $\gamma$  contengono un dominio PH aggiuntivo interrotto da domini SH, mentre le isoforme  $\beta$ , fatta eccezione per l'isoforma  $\beta_4$ , sono le uniche a contenere una lunga sequenza C-terminale di circa 450 residui, posta a valle del dominio Y. Infine la PLC- $\epsilon$  presenta nella regione N-terminale un dominio di tipo RasGEF (*Ras Guanine nucleotide Exchange Factor*) e nella regione C-terminale almeno un dominio di legame per Ras (dominio RA) (26).

Delle PI-PLC finora identificate, le 4 isoforme appartenenti alla famiglia delle PI-PLC beta sono state localizzate all'interno del nucleo e presentano una porzione aminoacidica a livello C-terminale ricca in residui basici fondamentale per la traslocazione al nucleo (27).

Anche membri della famiglia delle PI-PLC gamma sono presenti a livello nucleare, ma non presentano il classico NLS (segnale di localizzazione nucleare); è stato dimostrato che nel nucleo di cellule promielocitiche differenziate, l'isoforma PI-PLC  $\gamma_1$  forma un immunocomplesso con la protein Vav che, presentando un tipico NLS, potrebbe facilitare la migrazione intranucleare dell'enzima come è stato riportato anche in altri casi, per esempio I $\kappa$ B $\alpha$  (28, 29).

PI-PLC  $\delta 1$ , in cellule renali canine, si comporta come *shuttle* tra il citoplasma e il nucleo, mentre l'isoforma  $\delta 4$  è stata descritta come specificamente presente solo a livello nucleare in diverse linee cellulari (30, 31). L'isoforma  $\delta 1$  è associata con la cromatina, mentre l'espressione della  $\delta 4$  aumenta durante la transizione G1-S del ciclo cellulare.

Anche una delle nuove isoforme scoperte, la PI-PLC  $\zeta$ , è presente nel nucleo e sembra essere coinvolta nei meccanismi di regolazione del  $\text{Ca}^{2+}$  cellulare esclusivamente durante la fase M del ciclo cellulare (20).

### 1.1.4 PI-PLC $\beta 1$

Nei mammiferi sono stati identificati 4 isotipi di PI-PLC  $\beta$  e differenti varianti prodotte per splicing.

Il meccanismo di attivazione di questi enzimi è mediato da proteine G eterotrimeriche, inoltre presentano un'elevata attività GTPasica. Le isoforme beta presenti nei mammiferi sono diversamente distribuite a livello tissutale, in particolare la PI-PLC  $\beta 1$  localizza in specifiche regioni cerebrali.

La PI-PLC  $\beta 1$  esiste in due varianti prodotte per splicing alternativo, la PI-PLC  $\beta 1a$  e la PI-PLC  $\beta 1b$ , che differiscono a livello dei residui aminoacidici C-terminali (32).

A livello citoplasmatico, le PI-PLC  $\beta$  agiscono come effettori molecolari in seguito all'attivazione dei recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle rodopsine.

E' ormai noto che la PI-PLC  $\beta 1$  è l'isoforma prevalente a livello nucleare in diversi modelli cellulari e che la porzione C-terminale è fondamentale per la localizzazione all'interno del nucleo. Una delle prime osservazioni condotte su fibroblasti murini evidenziò che proprio l'attività dell'isoforma  $\beta 1$  veniva sollecitata in seguito a stimolazione con IGF-1 (33, 34).

In particolare, è stato visto che la PI-PLC  $\beta 1$  si localizza in precise regioni subnucleari chiamate speckles. Questi siti sono altamente dinamici, ovvero cambiano morfologia, assemblandosi e disassemblandosi durante la trascrizione: presentano ridotte dimensioni e sono più numerosi quando l'attività trascrizionale è elevata, mentre appaiono larghi e in numero inferiore quando il processo trascrizionale è inibito (35, 36). Questo comportamento viene spiegato dal fatto che rappresentano siti di accumulo per fattori di

splicing, piccole ribonucleoproteine (snRNP) e forme iperfosforilate di RNA polimerasi II e quindi probabilmente giocano un ruolo importante nell'associazione tra meccanismo di trascrizione e splicing post-trascrizionale (37, 38).

Si è visto che non solo la PI-PLC  $\beta 1$  è presente in queste strutture, ma anche altre molecole chiave del signaling lipidico, quali PIP<sub>2</sub>, DGK  $\tau$ , PI-PLC  $\delta 4$ , PI3K C2 $\alpha$ , PTEN e SHIP2, localizzano a livello degli speckles nucleari; in particolare, è stata dimostrata l'interazione tra PI-PLC  $\beta 1$ , DGK  $\tau$  e PIPK $\alpha$ .

Gli speckles, dunque, possono essere ritenuti siti chiave per il signaling lipidico nucleare, rafforzando l'ipotesi di un ruolo dei fosfoinositidi nella processazione dell'mRNA. Una possibile spiegazione può essere che il PIP<sub>2</sub> regoli questo meccanismo interagendo con il *core* enzimatico dello spliceosoma o con proteine citoscheletriche, quali la proteina 4.1, presenti negli speckles, oppure che il PIP<sub>2</sub> agisca solo come substrato di PI-PLC  $\beta 1$  dando avvio alla cascata di trasduzione che vede come secondi messaggeri IP<sub>3</sub> e DAG (39).

## **Regolazione dell'attività di PI-PLC $\beta 1$**

A livello citoplasmatico, l'attivazione di PI-PLC  $\beta 1$  è mediata da proteine G eterotrimeriche, sia da parte della subunità  $G\alpha_q/\alpha_{11}$  che  $G\beta/\gamma$ , agendo però su porzioni diverse dell'enzima: mentre la subunità  $G\alpha_q/\alpha_{11}$  interagisce con la porzione C-terminale, le subunità  $G\beta/\gamma$  riconoscono la porzione N-terminale del dominio PH.

A livello nucleare, il meccanismo di attivazione sembra essere diverso in quanto, sebbene alcuni autori abbiano riportato che  $G\alpha_i$  possa traslocare nel nucleo, non ci sono evidenze della presenza di  $G\alpha_q/\alpha_{11}$  in questo compartimento (40).

Diversi studi condotti in differenti linee cellulari esposte a stimoli proliferativi e differenziativi, hanno fatto emergere che PI-PLC  $\beta 1$  è l'unica isoforma che presenta un sito di fosforilazione per p42/44 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) a livello della coda C-terminale (41). In seguito a stimolazione con IGF-1 di fibroblasti murini, si osserva attivazione e traslocazione nucleare di MAPK, la quale può fosforilare PI-PLC  $\beta 1$  a livello della Ser<sup>982</sup> nel dominio C-terminale. Questa fosforilazione, però, non è di per sé sufficiente per l'attivazione dell'enzima, ma probabilmente è un segnale per il reclutamento di altri elementi regolatori fondamentali (42).

Per quanto concerne la terminazione del segnale, il DAG può indurre la proteina chinasi C  $\alpha$  a traslocare nel nucleo, la quale fosforila la PI-PLC  $\beta$ 1 su uno specifico residuo aminoacidico, la Ser<sup>887</sup>, inibendone l'attività. Questo meccanismo non è stato ancora chiarito completamente in quanto si è visto, in diversi studi *in vitro*, che la fosforilazione da parte di PKC  $\alpha$  non altera l'attività della PI-PLC  $\beta$ 1, ma sembra impedire l'interazione con G $\beta$ / $\gamma$  (43, 44). Anche il ruolo delle subunità G $\beta$ / $\gamma$  nell'inattivazione di PI-PLC  $\beta$ 1 non è stato ancora delucidato completamente per cui si può anche ipotizzare che la fosforilazione su Ser<sup>877</sup> possa influenzare l'interazione con altre proteine nucleari, non ancora identificate, portando allo spegnimento della cascata di trasduzione del segnale.

## **Ruolo della PI-PLC $\beta$ 1 nel differenziamento cellulare**

### **Differenziamento eritroide**

La linea cellulare eritroleucemica murina indotta con virus di Friend, denominata Felc, rappresenta un valido e versatile modello per lo studio del differenziamento eritroide. Morfologicamente queste cellule hanno l'aspetto di eritroblasti immaturi e sono Epo-indipendenti in quanto presentano un'attivazione costitutiva di EpoR (45). Il differenziamento eritroide può essere indotto in seguito a trattamento con DMSO (dimetilsolfossido) o altri agenti chimici planari-polari e prevede la sintesi di diverse proteine caratteristiche di questo processo, quali la  $\beta$ -globina. I cambiamenti fenotipici che si osservano sono dunque molto vicini a quelli della fase finale della normale eritropoiesi. Questa linea cellulare Felc è, inoltre, il primo modello sperimentale su cui è stata dimostrata l'esistenza di un distinto metabolismo nucleare degli inositidi (46).

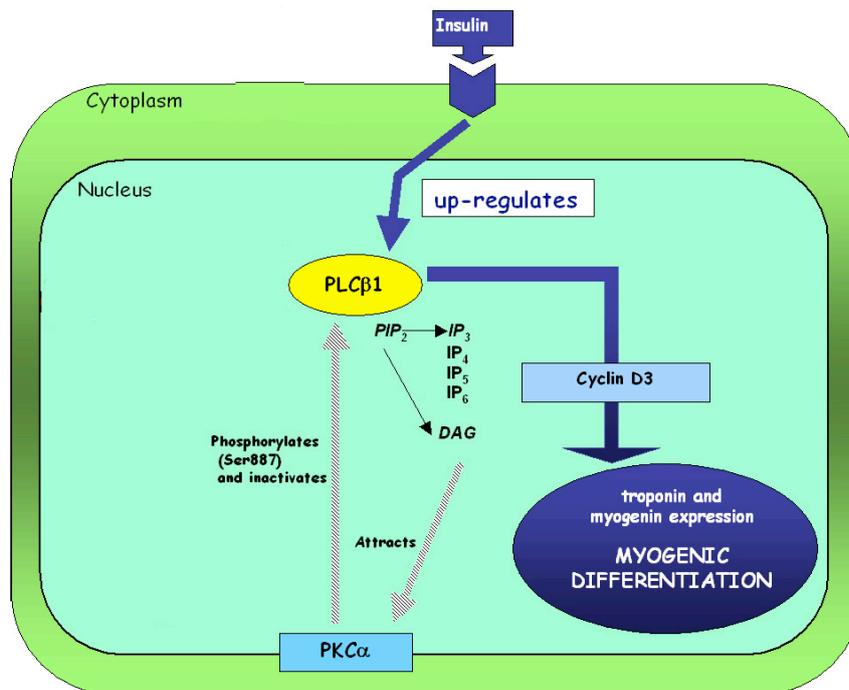
Inducendo il differenziamento delle Felc con il DMSO si osserva una diminuzione dell'attività della PI-PLC  $\beta$ 1 (27), della sua espressione e della massa di DAG (47). È stato dimostrato che la localizzazione nucleare della PI-PLC  $\beta$ 1 è fondamentale per il differenziamento eritroide: si è visto che l'overespressione della PI-PLC  $\beta$ 1 provoca un'inibizione del differenziamento eritroide indotto dal DMSO con conseguente diminuzione di espressione della  $\beta$ -globina e viene inoltre quasi completamente abolita l'attività del fattore di trascrizione p45/NF-E2. Per chiarire maggiormente il ruolo della PI-PLC  $\beta$ 1 nel differenziamento eritroide si è studiata l'espressione del fattore di trascrizione p45/NF-E2, coinvolto nella regolazione dell'espressione del gene della  $\beta$ -globina.

L'espressione di p45/NF-E2, che è un prerequisito del differenziamento delle cellule Felc, è indotta dal DMSO. L'overespressione della PI-PLC  $\beta$ 1 (entrambe le forme di splicing) riduce l'espressione della p45/NF-E2 (48). L'overespressione della PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare induce una stimolazione della proliferazione cellulare rallentando il processo differenziativo. Ciò è dovuto al fatto che in queste cellule vi è un aumento dell'espressione della ciclina D3, la quale, complessata con la sua chinasi cdk4, fosforila la proteina Rb (*retinoblastoma tumor suppressor*) anche in assenza di fattori di crescita. L'iperfosforilazione di questo oncosoppressore attiva il fattore di trascrizione E2F-1, fondamentale nella progressione del ciclo cellulare in quanto induce l'espressione di geni necessari per l'entrata nella fase S (49).

Nelle Felc è stato recentemente osservato mediante l'uso di microarrays a cDNA e tecnologie del siRNA che CD24 è una proteina effettrice della via di trasduzione del segnale dipendente dalla PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare (50). Con i microarrays si è confrontato l'effetto dell'overespressione della PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare con quella del mutante citoplasmatico M2b, che è esclusivamente localizzato nel citoplasma. Tra i 9000 geni analizzati si è individuato, nelle cellule che overesprimono PI-PLC  $\beta$ 1, un aumento nell'espressione del gene della CD24, che codifica per un antigene coinvolto nel differenziamento e nell'emopoiesi. Tale correlazione è rafforzata dall'osservazione che il silenziamento della PI-PLC  $\beta$ 1 con il siRNA porta alla riduzione dell'espressione della CD24. Sempre nello stesso modello cellulare si è mostrato di recente, attraverso un approccio di proteomica di espressione, che l'espressione nucleare della PI-PLC  $\beta$ 1 modula l'espressione di SRp20, un fattore di splicing appartenente alla famiglia delle proteine SR, ricche in residui di serina e arginina, e che SRp20 e la PI-PLC $\beta$ 1 interagiscono direttamente a livello degli *speckles*. Queste scoperte rivelano l'importanza della PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare nel differenziamento eritroide *in vitro* (51).

## **Differenziamento muscolare**

La linea cellulare murina C2C12 rappresenta un modello riconosciuto e riproducibile del processo di miogenesi, per questo motivo è stata utilizzata per determinare il ruolo svolto dalla PLC- $\beta$ 1 nel processo di differenziamento muscolare (52). L'induzione di questo processo avviene nei mioblasti C2C12 attraverso la stimolazione con fattori di crescita appartenenti alla famiglia degli *Insulin-like Growth Factors* (IGFs), in particolare IGF-I, IGF-II ed insulina (53).



**Figura 3 - Ruolo della PLC-β1 nucleare nel differenziamento miogenico indotto da insulina, nella linea cellulare murina C2C12.** Faenza, I. et al. Nuclear phospholipase C beta1 and cellular differentiation. *Front Biosci* 13, 2452-63 (2008).

Nei mioblasti murini C2C12 sono espresse almeno tre isoforme di PLC-β, precisamente β1, β3 e β4, con differente distribuzione cellulare. Infatti mentre la PLC-β1 è localizzata prevalentemente nel nucleo, la PLC-β3 è distribuita sia nel nucleo che nel citoplasma e la PLC-β4 si trova esclusivamente nel compartimento citosolico. Durante il differenziamento miogenico indotto da insulina l'andamento dell'espressione delle diverse isoforme della fosfolipasi C varia. Infatti mentre i livelli di PLC-β1 vengono incrementati, quelli della PLC-β3 non subiscono variazioni (54, 55). Un'analisi più dettagliata circa il coinvolgimento della PLC-β1 nel differenziamento miogenico ha evidenziato che l'aumento di espressione è indotto nelle fasi precoci di questo processo, ovvero durante le prime 24 ore quando la troponina T, un marcatore di differenziamento miogenico, non risulta ancora essere espressa. Inoltre è stato osservato che i livelli di espressione aumentano progressivamente durante il processo differenziativo. La PI-PLC-β1 è poi risultata essere necessaria per l'induzione dell'espressione della miogenina in seguito a stimolazione con insulina (Fig.3).

E' stato inoltre dimostrato che la localizzazione nucleare della PLC- $\beta$ 1 è essenziale per l'induzione del differenziamento, come hanno evidenziato esperimenti condotti con un mutante della PI-PLC  $\beta$ 1 privato della capacità di distribuirsi al nucleo. Questo mutante si accumula a livello citosolico dove agisce da dominante negativo per la localizzazione nucleare della PLC- $\beta$ 1 (56). Ne consegue quindi l'inibizione della miogenesi indotta da insulina, come è stato dimostrando andando a valutare l'espressione di miogenina in seguito all'espressione del mutante citosolico (57).

Uno studio recente ha sottolineato che durante le fasi precoci del differenziamento miogenico la PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare è in grado di regolare l'espressione della ciclina D3, andando a influenzare l'attivazione del suo promotore (54). Durante l'arresto del ciclo cellulare l'espressione della maggior parte delle cicline diminuisce, fatta eccezione per la ciclina D3, in quanto questa proteina ricopre un ruolo fondamentale nella fase dell'arresto del ciclo cellulare mediato da MyoD. Nelle fasi precoci del differenziamento infatti MyoD attiva la ciclina D3 che a sua volta va a sequestrare la proteina pRb non fosforilata determinando l'uscita irreversibile dei mioblasti dal ciclo cellulare (58). Coerentemente con l'osservazione che la ciclina D3 ricopre un ruolo nel differenziamento miogenico, è stata evidenziata la presenza, nella regione 5' non codificante del suo promotore, di numerose "E-box", contenenti siti di legame per i fattori di trascrizione miogenici che attivano l'espressione dei geni strutturali muscolo-specifici (59).

Si è visto che anche la PI-PLC  $\gamma$ 1 ha un ruolo nel differenziamento miogenico ed agisce sul promotore della ciclina D3, ma in una regione distinta. Infatti mentre la regione del promotore compresa tra -446 e -190 paia di basi risulta essere attivata dall'espressione della PI-PLC  $\beta$ 1, le regioni da -1680 a -957 e da -190 al sito di inizio della trascrizione sono controllate dall'attività della PI-PLC  $\gamma$ 1 (54). Questi dati suggeriscono che entrambe le isoforme della PLC non solo sono regolatori fondamentali dell'espressione della ciclina D3 nel differenziamento miogenico, ma anche che l'induzione della trasduzione del segnale PLC-dipendente da parte dell'insulina determina l'attivazione di almeno due vie distinte di segnalazione lipide-dipendente.

L'esistenza di una relazione tra la funzione e la localizzazione della PI-PLC  $\beta$ 1 e della PI-PLC  $\gamma$ 1 sembra essere supportata da dati che hanno sottolineato l'importanza dell'organizzazione nucleare per il raggiungimento del differenziamento muscolare. E' stato ipotizzato che la PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare, attraverso la sua azione sulla ciclina D3, possa essere coinvolta nella riorganizzazione della lamina nucleare. E' stato infatti dimostrato

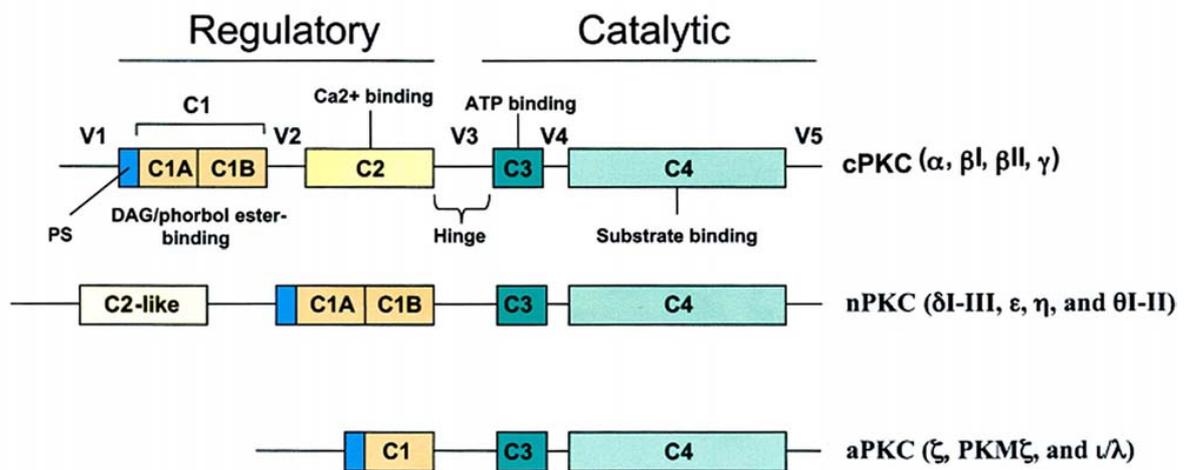
che nelle cellule muscolari i cambiamenti nell'organizzazione della lamina A/C possono essere influenzati dall'azione della ciclina D3 con il coinvolgimento della proteina pRb (60).

Studi di co-localizzazione sui mioblasti C2C12 hanno poi messo in evidenza che la PI-PLC  $\beta 1$  nucleare è legata all'isoforma  $\zeta$  della diacilglicerolo chinasi (DGK). Anche i livelli di questa chinasi aumentano durante il differenziamento miogenico e l'inibizione del suo incremento determina a sua volta un'inibizione del processo differenziativo (61). L'associazione fisica tra questi due enzimi potrebbe essere importante dal punto di vista funzionale, in quanto la PI-PLC  $\beta 1$  produce DAG che è il substrato della DGK che a sua volta genera acido fosfatidico (PA). E' stato mostrato che il PA è a sua volta in grado di attivare la PI-PLC  $\beta 1$  attraverso il legame con la sua regione C-terminale (62).

## 1.2 Le Protein chinasi C

Le proteine chinasi C (PKC) costituiscono una famiglia di proteine ad attività fosfotrasferasica su residui serinici e treoninici ed hanno un ruolo regolatorio fondamentale in molti processi cellulari che includono proliferazione e progressione del ciclo cellulare, differenziamento, tumorigenesi, apoptosi, rimodellamento citoscheletrico, modulazione dei canali ionici e secrezione cellulare. Questi enzimi furono identificati per la prima volta nel 1995 da Nishizuka e collaboratori come proteine chinasiche istoniche nel tessuto cerebrale di ratto.

Ad oggi sono state identificate 12 isoforme di PKC nei mammiferi e vengono comunemente suddivise in tre famiglie, perché sebbene tutte necessitino di fosfolipidi per la loro funzione, differiscono in struttura e per i cofattori che richiedono per la loro attivazione: le PKC classiche o convenzionali (cPKC) comprendono le isoforme  $-\alpha$ ,  $-\beta 1$ ,  $-\beta 2$  e  $-\gamma$ , richiedono  $Ca^{2+}$ , fosfatidilserina e DAG o esteri del forbolo; le PKC "nuove" (nPKC), ovvero le isoforme  $-\delta$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\eta$  (anche conosciuta come PKC-L),  $-\theta$  e  $-\mu$  (isoforma del topo omologa all'isoforma umana conosciuta anche come PKD), sono  $Ca^{2+}$  indipendenti e richiedono solo DAG e fosfatidilserina per la loro attivazione; infine le PKC atipiche (aPKC) comprendono la  $-\zeta$ ,  $-\iota$  e la  $-\lambda$  (isoforma del topo omologa all'isoforma umana  $\iota$ ) e non richiedono né  $Ca^{2+}$  né DAG per essere attivate, ma solo fosfatidilserina o fosfolipidi o acido fosfatidico. Recentemente è stata identificata una nuova isoforma, la

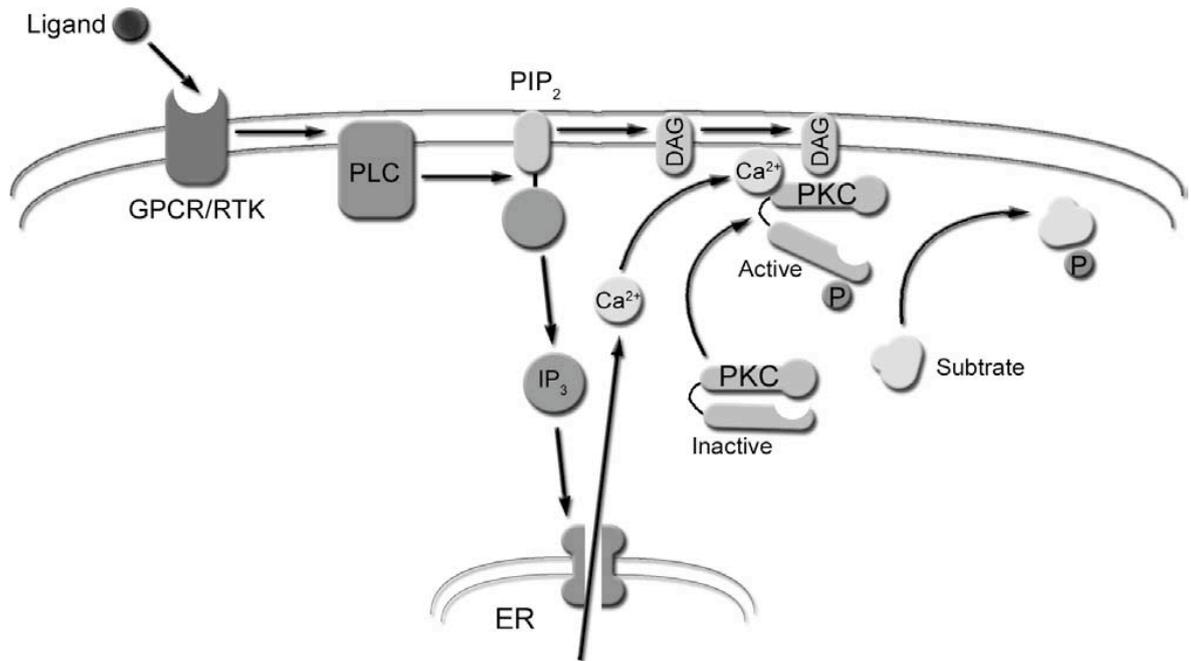


**Figura 4 - Rappresentazione schematica dei domini delle PKC.** Tan S.L. and Parker P.J. Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J* 376(3),545-52 (2003).

PKC $\nu$ , molto simile all'isoforma PKC $\mu$ /PKD.

Strutturalmente, le PKC presentano domini conservati (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) interrotti da regioni variabili (V<sub>1</sub>-V<sub>5</sub>). Le regioni C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> servono per la localizzazione e rappresentano due moduli di indirizzamento alla membrana. Tutte le isoforme presentano un dominio regolatorio N-terminale che contiene una regione pseudosubstrato e un dominio catalitico C-terminale altamente conservato che comprende le porzioni C<sub>3</sub> (dominio legante l'ATP) e C<sub>4</sub> (dominio chinasi). La dipendenza dal Ca<sup>2+</sup> per l'attivazione della funzione chinasi è conferita dal dominio C<sub>2</sub>; il sito di legame agli esteri del forbolo si trova nella regione C<sub>1</sub> ed è costituito da due sottodomini simili a *zinc finger* ricchi in cisteine: in particolare, due residui cisteinici sono fondamentali, infatti le aPKC, che mancano di uno dei due residui, non possono essere attivate dagli esteri del forbolo. Non sono ancora stati identificati, invece, i siti di legame per gli attivatori lipidici (Fig.4).

L'attivazione delle PKC sembra indurre la traslocazione dall'ambiente citosolico a quello di membrana; queste traslocazioni possono avvenire in differenti modi e scatenare diversi eventi di trasduzione del segnale. L'attività delle PKC viene quindi regolata a seconda della compartimentalizzazione cellulare, che sembra essere prevalentemente a livello della membrana plasmatica e nel citoplasma dato che molte PKC, nello stato inattivo, sono associate al citoscheletro mentre a seguito di fosforilazione vengono reclutate a livello



**Figura 5 - Rappresentazione schematica dell'attivazione di PKC.**

L'attivazione di un recettore accoppiato a proteine G (GPCR) o di un recettore tirosina chinasi (RTK), media la produzione di IP<sub>3</sub> e DAG. Il DAG attiva e media la traslocazione di PKC alla membrana cellulare, citoscheletro e nucleo. L'IP<sub>3</sub> promuove il rilascio delle riserve intracellulari di Ca<sup>2+</sup> potenziando così l'attivazione di cPKC. Le PKC così attivate possono fosforilare substrati specifici su residui di serina/treonina. Koivunen J et al. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters* 235, 1-10 (2006).

della membrana plasmatica dove sono definitivamente attivate in presenza dei cofattori specifici (Fig.5). E' stato però dimostrato che quasi tutte le PKC possono essere presenti anche a livello nucleare sia come presenza fissa che in seguito a traslocazione indotta da particolari stimoli. Si è visto che nel nucleo, le PKC possono localizzare in distretti differenti a seconda delle isoforme: per esempio, la PKC $\alpha$  si trova sia a livello della membrana nucleare interna che dei domini intercromatinici, associata alla lamina e alla matrice nucleare; la PKC $\delta$  è stata trovata localizzata solo nei nucleoli mentre la PKC $\zeta$  solo a livello della matrice nucleare (63).

### 1.2.1 Proteine nucleari che legano PKC

Negli ultimi dieci anni sono state identificate molte proteine che interagiscono con PKC fra

cui vinculina e talina, che costituiscono i contatti focali tra le cellule.

In generale, le proteine che interagiscono con PKC sono classificate come STICKs, ovvero substrati che interagiscono con proteine chinasi C, RICKs, recettori per PKC inattive, o RACKs, recettori per PKC attivate. Tutte le STICKs sono proteine che legano fosfolipidi e sono generalmente localizzate tra la membrana e le strutture citoscheletriche, mentre le RACKs interagiscono direttamente con il dominio C<sub>2</sub> delle PKC. Queste ultime sono fondamentalmente proteine di ancoraggio ed hanno il ruolo di indirizzare le PKC nei vari compartimenti cellulari, come i contatti focali, l'apparato di Golgi, le caveole e le strutture citoscheletriche.

Sono state invece identificate come STICKs, quindi substrati di PKC, proteine quali la lamina A/C e la C23/nucleolina. In particolare, è stata caratterizzata l'interazione molecolare fra PKC $\alpha$  e lamina A e B, per la quale risulta essere fondamentale il dominio C<sub>2</sub>; la specificità di interazione sembra essere però conferita dalla regione V<sub>5</sub> per la lamina A e dalla regione V<sub>1</sub> per la lamina B. Sono stati identificati anche altri STICKs nucleari per PKC $\alpha$ , fra cui PSF, fattore di splicing associato a PTB, la RNA elicasi p68 e le ribonucleoproteine A3 e L.

Rosenberger e collaboratori hanno identificato numerose proteine di ancoraggio di PKC $\alpha$  e hanno osservato che tutte interagiscono con l'RNA e sono coinvolte nei meccanismi di splicing (63).

### **1.2.3 Substrati nucleari di PKC**

L'identificazione delle proteine che vengono riconosciute e sono substrato di PKC riveste un ruolo chiave per la comprensione del ruolo di questi enzimi e dei cambiamenti indotti a seguito della loro fosforilazione. Nel corso degli anni, sono state riconosciuti numerosi substrati nucleari, elencati in Tabella 1.

All'interno del nucleo la funzione delle PKC è collegata ai processi di regolazione della replicazione del DNA, alla sintesi e processazione dell'RNA, all'espressione genica, al trasporto nucleo-citoplasma e alla struttura della cromatina. Tuttavia non è ancora stato completamente chiarito il meccanismo con cui queste interazioni avvengono, per esempio se la fosforilazione di questi substrati avvenga realmente nel nucleo o in altri compartimenti, oppure quali sono le conseguenze funzionali di queste fosforilazioni. Ci

Table 1  
Nuclear PKC substrates

Phosphorylated protein	In vitro/in vivo	PKC isoform	Effect of phosphorylation
Histone H1	In vitro	All classes	n.d.
Histone H2B	In vitro/in vivo	$\delta$	Apoptotic DNA fragmentation ( ? )
Histone H3	In vitro/in vivo	$\alpha$	Enhanced gene transcription
Lamin A	In vitro/in vivo	n.d.	Lamin disassembly/nuclear targeting
Lamin C	In vitro/in vivo	n.d.	n.d.
Lamin B	In vitro/in vivo	$\alpha, \beta, \delta$	Mitotic/apoptotic lamin disassembly
DNA topoisomerase I	In vitro	n.d.	Enzyme activation
DNA topoisomerase II $\alpha$	In vitro	n.d.	Enzyme activation
DNA polymerase $\beta$	In vitro	n.d.	Enzyme inactivation
DNA methyltransferase	In vitro	n.d.	n.d.
PARP	In vitro	$\beta$	Enzyme inactivation
B23/nucleophosmin	In vitro	n.d.	n.d.
Fos	In vitro	n.d.	n.d.
MRF4	In vitro/in vivo	n.d.	Inhibition of DNA binding activity
Vitamin D3 receptor	In vitro/in vivo	$\beta$	Transcriptional activation
BZLF1	In vitro/in vivo	$\alpha$	Enhanced DNA binding
RNA polymerase II	In vitro	n.d.	Increased RNA synthesis rate
hnRNP A1	In vitro	n.d.	Inhibition of strand annealing activity
hnRNP K	In vitro	$\delta$	n.d.
PSF	In vitro	$\alpha$	Inhibition of RNA binding
C23/nucleolin	In vitro/in vivo	$\zeta$	n.d.
Centaurin- $\alpha_1$	In vitro	All classes	n.d.
CREB	In vitro	n.d.	n.d.
PI-PLC $\beta$ 1	In vitro/in vivo	$\alpha$	Enzyme inactivation
HMG proteins	In vitro	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	DNA binding affinity reduction
p53	In vitro	n.d.	Increased DNA binding affinity
TR2	In vivo	n.d.	Enhancement of activating ability
NSPc1	In vivo	n.d.	Transcriptional repression
DNA-PK	In vitro	$\delta$	Enzyme inhibition
Rad9	In vitro/in vivo	$\delta$	Rad9 complex formation
c-Abl	In vitro	$\delta$	Enzyme activation
p73 $\beta$	In vitro	$\delta$	Induction of transactivating activity

n.d. not determined.

**Tabella 1 - Substrati nucleari di PKC (63).**

sono alcune eccezioni, per esempio si è visto che la fosforilazione della lamina B è un evento fondamentale per il disassemblamento nucleare durante la transizione G2/M e nella fase di esecuzione dell'apoptosi; inoltre, la fosforilazione della PI-PLC  $\beta$ 1 su serina<sup>887</sup> da parte di PKC $\alpha$ , in risposta a stimolo mitogenico, ha la funzione di down-regolare l'attività della fosfolipasi (63).

La fosforilazione mediata da PKC è un meccanismo importante per il controllo dei processi intracellulari ed ha un ruolo chiave nelle cascate di trasduzione del segnale che regolano la crescita cellulare in risposta a stimoli extracellulari. Come già detto, sono state identificate numerose PKC e l'identificazione dei substrati su cui questi enzimi agiscono interessa numerosi gruppi di ricerca. Diversi studi hanno dimostrato che la sequenza primaria delle proteine substrato è di fondamentale importanza nella determinazione della specificità della chinasi che le riconosce, sebbene questa informazione sia disponibile solo

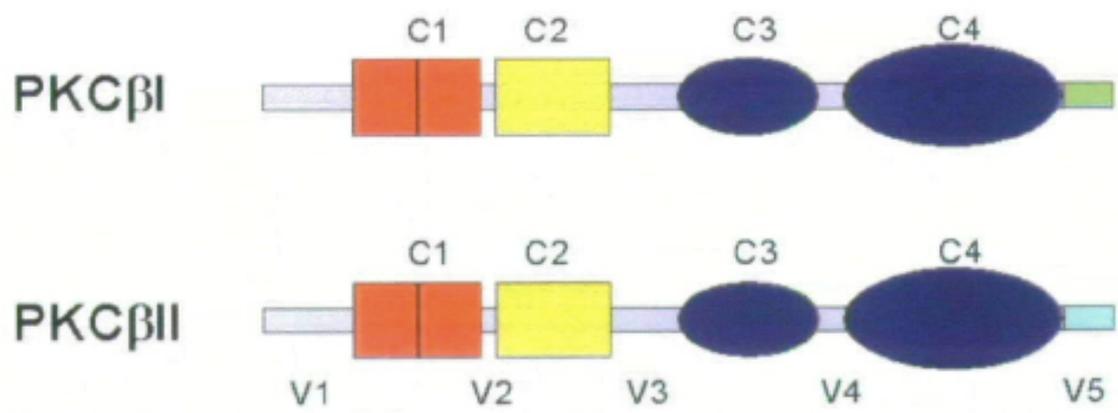
per un numero limitato di enzimi.

Cantley, Songyang e collaboratori hanno sviluppato un metodo per determinare la sequenza ottimale riconosciuta dalle proteine chinasi, fra cui PKC. La chinasi d'interesse viene aggiunta ad una soluzione che contiene una libreria degenerata di circa 2.5 bilioni di peptidi, della medesima lunghezza e con un solo aminoacido fosforilabile in una posizione nota. Al termine dell'incubazione, la piccola frazione di peptidi fosforilati viene separata dalla miscela abbondante di quelli non fosforilati e sequenziata. Gli aminoacidi che vengono preferenzialmente fosforilati e le relative posizioni, vengono determinate confrontando gli aminoacidi presenti nelle posizioni N-terminali e C-terminali adiacenti al residuo fosforilato, con la miscela di partenza non fosforilata. Questa tecnica può così predire l'ottimale sequenza consenso senza avere informazioni sul reale sito fosforilato in vivo e consente di ottenere informazioni sull'importanza relativa della posizione e sulla tolleranza dei residui adiacenti all'aminoacido fosforilato.

Utilizzando questa libreria, gli autori hanno identificato i peptidi substrato ottimali per nove isoforme umane di PKC. Sebbene ciascuna PKC abbia un proprio unico motivo specifico, ci sono elementi comuni a tutte le PKC ed altri comuni per ciascuna famiglia. Il motivo generale comune a tutte che è stato determinato è RXXS/TXRX dove X indica un aminoacido qualsiasi: tutte le PKC quindi, preferiscono un substrato con un residuo basico in posizione -3 e un residuo idrofobico, solitamente una fenilalanina, in posizione +1. Tuttavia, il gruppo delle cPKC si distingue dagli altri perché riconoscono preferenzialmente substrati con residui basici in posizione -6, -4, -2, +2 e +3. Anche il gruppo delle nPKC e l'aPKC $\zeta$  selezionano i substrati che presentano residui basici in posizione -6, -4 e -2, ma non in posizione +2 e +3, nelle quali preferiscono residui idrofobici. (64, 65).

#### 1.2.4 PKC $\beta$

Sono state identificate due isoforme di PKC  $\beta$ , PKC  $\beta$ I e PKC  $\beta$ II, generate da splicing alternativo a livello degli esoni C-terminali (Fig. 6). La differenza tra questi due enzimi risiede a livello del dominio C-terminale V<sub>5</sub>. Si è visto che entrambe hanno un ruolo in differenti percorsi di trasduzione del segnale che regolano proliferazione, differenziamento



**Figura 6 - Domini strutturali di PKC βI e PKC βII.**

Le due isoforme differiscono solamente a livello della regione V5, ma i siti di autofosforilazione (Thr641 e Ser660 in PKC βII) sono conservati. Kawakami T et al. Protein Kinase Cp (PKCp): Normal Functions and Diseases. *J Biochem* 132, 677-682 (2002).

e metabolismo cellulare. Il ruolo della PKC β è ben caratterizzato, in particolare, in due percorsi di trasduzione, quello indotto dall'insulina (Fig. 7) e quello che regola la risposta immunitaria.

Come già detto, a seguito di stimolazione del recettore dell'insulina, si ha attivazione di PI-PLC, produzione di DAG che può attivare, a turno, parecchie isoforme di PKC. A loro volta le PKC possono attivare Ras e il percorso Raf-MEK-ERK. Sulla base di evidenze sperimentali condotte con oligonucleotidi antisense e utilizzando inibitori farmacologici di PKC β, è stato proposto un meccanismo di regolazione da parte di PKC β in seguito a stimolo mitogenico, riassunto in figura. In diversi modelli cellulari però, l'attivazione di PKC è associata ad una inibizione del recettore insulinico ad attività tirosino-chinasica (PTK), il che contribuisce all'insorgenza del diabete mellito. È stato inoltre dimostrato il coinvolgimento di PKC βII nello sviluppo di retinopatie e neuropatie associate alla patologia diabetica: in questi processi il meccanismo di neovascolarizzazione gioca un ruolo molto importante e una delle molecole chiave è il fattore di crescita angiogenetico VEGF. È stato suggerito che, data l'interazione fisica che si instaura tra PKC βII e la proteina Rb, la fosforilazione di quest'ultima da parte di PKC βII potrebbe portare ad un aumento dell'attività trascrizionale di EF2 e della proliferazione delle cellule endoteliali indotta da VEGF; l'attivazione di PKC β è inoltre coinvolta nella deposizione della fibrina in processi di vascolarizzazione conseguenti a danno ipossico.

PKC β esercita un ruolo molto importante anche nello sviluppo e nell'attivazione delle

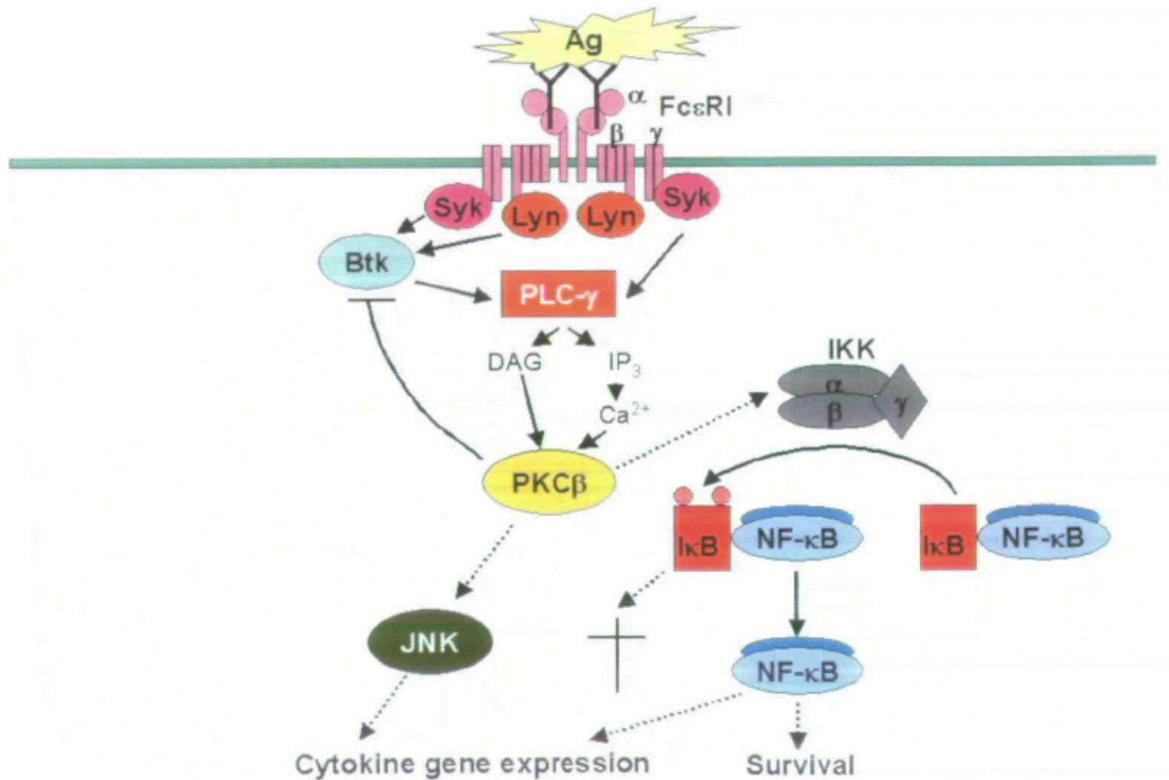
cellule B, il cui meccanismo di regolazione è riassunto in Figura 8. Di particolare interesse è che il segnale che deriva dall'interazione Btk/ PKC  $\beta$ I è coinvolto nella produzione di IL-2 e TNF- $\alpha$ , inoltre si è visto che PKC  $\beta$ I è necessaria per la secrezione di IL-2 in cellule T stimulate con PMA (66).

In un lavoro recente è stato dimostrato che la cascata di trasduzione evocata da PKC  $\beta$ I e che coinvolge NF- $\kappa$ B ha un ruolo importante anche in cellule enterocitiche prevenendo il fenomeno di iperpermeabilità della barriera enterocitica indotto da fattori ossidativi: l'attivazione di PKC  $\beta$ I comporterebbe la soppressione di NF- $\kappa$ B, la conseguente diminuzione di fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$ , stabilizzazione dei livelli di I $\kappa$ B $\alpha$ , inibizione della traslocazione nucleare e dell'attivazione delle subunità di NF- $\kappa$ B. Sempre a questo livello, l'attivazione di PKC  $\beta$ I aumenterebbe la stabilità della polimerizzazione dei filamenti di actina, riducendo l'actina G instabile proteggendo così l'integrità del monostato cellulare (67).

### 1.3 Il differenziamento miogenico

Il differenziamento miogenico è un processo finemente regolato, caratterizzato dal susseguirsi di una serie di eventi ben definiti, quali la proliferazione dei mioblasti, la loro uscita dal ciclo cellulare, la fusione delle cellule per formare miotubi multinucleati e la conseguente maturazione delle fibre. Il differenziamento miogenico richiede l'interazione di numerosi processi cellulari e il succedersi di una serie di eventi regolati da numerosi *check point* attivi a livello trascrizionale (68-73). In particolare vengono coinvolte due grandi famiglie di fattori di trascrizione: la famiglia MyoD dei *Muscle Regulatory Factors* (MRF) (74) e la famiglia Mef2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) dei fattori di trascrizione contenenti MADS-box (75). E' dunque l'equilibrio che si instaura tra i fattori che regolano positivamente la progressione del ciclo cellulare ed i fattori che inibiscono questa progressione a determinare se i mioblasti proseguiranno con la proliferazione cellulare o se al contrario andranno ad attivare il processo di differenziamento miogenico (76).

I MRF sono fattori di trascrizione contenenti un dominio basico elica-loop-elica che si lega a siti consenso, denominati "E-box", presenti nelle regioni dei promotori e degli *enhancer*



**Figura 7 - PKC  $\beta$  nella cascata di trasduzione del segnale mediata dal recettore immunitario.**

Btk fosforila e attiva la PI-PLC  $\gamma$  in cooperazione con Syk. Dag e IP<sub>3</sub> così prodotti attivano varie PKC fra cui PKC  $\beta$ I. PKC  $\beta$ I così attivata fosforila Btk su Ser<sup>180</sup> inibendolo con un meccanismo a feedback. PKC  $\beta$  può anche regolare la trascrizione di diverse citochine e geni della sopravvivenza cellulare come bcl-X<sub>L</sub>, attraverso la via JNK-IKK. Kawakami T et al. Protein Kinase Cp (PKCp): Normal Functions and Diseases. J Biochem 132, 677-682 (2002).

dei geni muscolo-specifici (77). Fanno parte di questa famiglia i fattori di trascrizione: MyoD, Myf5, miogenina e MRF4(Myf6) (68).

MyoD e Myf5 risultano essere espressi nei mioblasti proliferanti già prima dell'induzione del processo differenziativo, la loro attivazione prematura viene impedita da numerosi meccanismi di controllo, quali modificazioni post-traduzionali e l'associazione con repressori e con proteine che ne impediscono l'interazione con il DNA (78). L'uscita dei mioblasti dal ciclo cellulare necessita dunque dell'inattivazione di questi repressori permettendo così l'attivazione dei MRF (79, 80).

Al fine di promuovere l'espressione dei geni muscolo-specifici i fattori MRF sono coadiuvati dalla famiglia di fattori di trascrizione Mef2. Questa famiglia comprende

quattro membri (Mef2A, Mef2B, Mef2C e Mef2D) che si legano ad una sequenza consenso ricca in A/T, presente anch'essa in numerosi promotori di geni muscolo-specifici (75).

Mentre l'espressione forzata dei MRF in colture di cellule non di origine muscolare può causarne il differenziamento in senso miogenico, con un livello di efficienza che varia a seconda del tipo cellulare (81, 82), le proteine Mef2 non sono in grado da sole di indurre il programma differenziativo, consolidando quindi l'ipotesi che questi fattori ricoprano il ruolo fondamentale di "assistenti" dei fattori MRF (83). Generalmente nelle regioni dei promotori e degli enhancer dei geni muscolo-specifici, le E-box e i siti di legame per i fattori Mef2 si trovano in prossimità gli uni rispetto agli altri, supportando così il modello secondo il quale MyoD e Mef2 si legano al DNA e promuovono l'inizio della trascrizione in modo cooperativo (84).

In seguito all'induzione del differenziamento, MyoD e Myf5 vengono attivati e vanno a modulare, seppur con cinetiche diverse, l'espressione di numerosi geni che partecipano ad un'ampia gamma di funzioni biologiche (85). In particolare, nelle fasi precoci viene indotta l'espressione della miogenina e quella di due inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (*cyclin-dependent kinases*, cdk) ovvero p21<sup>Waf/Cip1</sup> e p57<sup>KIP2</sup> (86, 87). Questi due inibitori possono legarsi direttamente alle cdk o ai complessi che si formano tra le cdk e le cicline, i loro partner regolatori (88), inibendone l'attività e determinando così l'arresto irreversibile della progressione del ciclo cellulare (89). L'induzione degli inibitori delle cdk causa inoltre l'attivazione di pRb (Retinoblastoma protein). Infatti essendo pRb inattivata attraverso la fosforilazione da parte delle cdk, l'inattivazione delle cdk stesse mediata dai cdk-inibitori causa la mancata fosforilazione di pRb e la sua conseguente attivazione.

In seguito all'induzione del processo differenziativo i mioblasti vengono dunque bloccati nella fase G0/G1 del ciclo cellulare, ne consegue che l'espressione della maggior parte delle cicline viene ridotta (90). L'unica eccezione è rappresentata dalla ciclina D3 la cui espressione al contrario viene indotta nel differenziamento miogenico (91).

Nelle fasi successive si osserva poi la trascrizione dei geni strutturali e la conseguente espressione di marcatori tardivi di differenziamento, come le catene leggere e pesanti della miosina, la creatin chinasi muscolare e il recettore dell'acetilcolina. Infine le fasi terminali del processo differenziativo sono caratterizzate dalla fusione delle cellule, dalla formazione di miotubi multinucleati e dalla comparsa delle proteine che vanno a formare l'apparato contrattile.

### 1.3.1 Il ruolo dell'insulina nella regolazione della sintesi proteica

L'insulina è una molecola in grado di stimolare la sintesi proteica in molti tipi di cellule e tessuti, fra cui il tessuto muscolare umano e di ratto e molte linee cellulari coltivate *in vitro*. Questo comporta il susseguirsi di due eventi fondamentali, uno a breve termine che determina l'attivazione rapida di componenti già presenti dell'apparato traduzionale, i fattori di traduzione, e uno a lungo termine che prevede una risposta cellulare in termini di sintesi proteica, fra cui un aumento del numero dei ribosomi.

La sintesi proteica è convenzionalmente distinta in tre fasi, fase d'inizio, di elongazione e di terminazione.

La fase d'inizio prevede il trasporto dell'mRNA e del tRNA iniziatore che porta l'amminoacido metionina (tRNA<sup>Met</sup>), alla subunità minore 40S del ribosoma. A questo livello avviene il riconoscimento del codone d'inizio da parte del tRNA<sup>Met</sup>, il che comporta l'assemblaggio completo del ribosoma richiamando la subunità maggiore 80S e avvia la successiva fase di elongazione, che prevede la sintesi della nuova catena polipeptidica.

Entrambe queste prime due fasi possono essere controllate dall'insulina. Il trasporto del tRNA<sup>Met</sup> al ribosoma è mediato dal fattore eucariotico d'iniziazione eIF2, una proteina eterotrimerica che lega il GTP ed è proprio grazie al processo di scambio GTP/GDP che avviene il rilascio del tRNA<sup>Met</sup>. La proteina che regola lo scambio GDP/GTP sull'eIF2, eIF2B, viene attivata dall'insulina, inibendo la glicogeno sintetasi chinasi 3 (GSK3) ovvero la proteina kinasi che fosforila eIF2B su un singolo residuo serinico del dominio catalitico. Questo comporta la de fosforilazione di eIF2B contribuendo alla sua attivazione.

E' stato in seguito scoperto che la via di trasduzione del segnale che induce l'inattivazione di GSK3 mediata da insulina, è quella di PI3K che, attraverso Akt, fosforila direttamente GSK3.

Il trasporto dell'mRNA al ribosoma coinvolge l'interazione fra eIF4G ed eIF4E mediante un breve motivo presente anche in altre proteine che legano eIF4E, la meglio conosciuta delle quali è 4E-BP1, la cui fosforilazione è promossa dall'insulina non in maniera PI3K dipendente, ma anche via mTOR, su differenti siti. mTOR è una proteina kinasi il cui dominio catalitico è molto simile ad altre kinasi lipidiche, quali PI3K. Alcune funzioni di mTOR, fra cui la fosforilazione di 4E-BP1 e il suo rilascio da eIF4E, sono bloccate dalla

ripamicina. Il meccanismo di regolazione da parte dell'insulina è finemente regolato e comporta prima la fosforilazione a livello terminale su uno specifico motivo (Arg-Ala-Ile-Pro) a seguito del quale possono venire fosforilati, in maniera indotta da insulina, specifici residui (Ser<sup>65</sup> e Thr<sup>790</sup>) subito adiacenti al sito di legame per eIF4E.

La regolazione di mTOR mediata da insulina si propaga tramite il complesso proteico TSC1-TSC2 (*tuberous sclerosis complex*): TSC2 viene fosforilato da Akt in risposta all'insulina e questo ne sembra influenzare negativamente l'attività GTPasica, anche se il meccanismo non è ancora completamente chiaro.

Questa capacità, di fattori come l'insulina, di attivare la sintesi proteica, probabilmente contribuisce anche agli effetti a lungo termine che questa molecola induce all'interno delle cellule: per esempio mTOR è in grado di regolare anche un'altra proteina chinasi, S6k, che può down-regolare la cascata di trasduzione del segnale indotta dall'insulina, agendo direttamente sul recettore IRS1 (*insulin receptor substrate 1*), fosforilandolo.

La fase di elongazione, nei mammiferi, richiede l'attività di due fattori di elongazione eucariotici, eEF1 ed eEF2.

eEF2 è il fattore che induce lo spostamento del ribosoma alla tripletta successiva sull'mRNA dopo l'aggiunta di un nuovo aminoacido. La fosforilazione di questo fattore a livello della Thr<sup>56</sup> ne inficia la capacità di interagire con il ribosoma, inattivandolo. L'insulina determina una rapida defosforilazione di eEF2, inducendo così un rapido aumento della sintesi proteica; inoltre, l'insulina provoca una diminuzione dell'attività dell'eEF2 chinasi, calcio-calmodulina dipendente. Si è visto che entrambi questi eventi sono bloccati dalla ripamicina, il che implica un ruolo chiave di mTOR e della cascata di trasduzione PI3K-dipendente: è stato dimostrato che mTOR è in grado di fosforilare eEF2 almeno a livello di tre siti specifici (Ser<sup>366</sup>, Ser<sup>359</sup>, Ser<sup>78</sup>), provocando un'inibizione dell'attività di eEF2 (92).

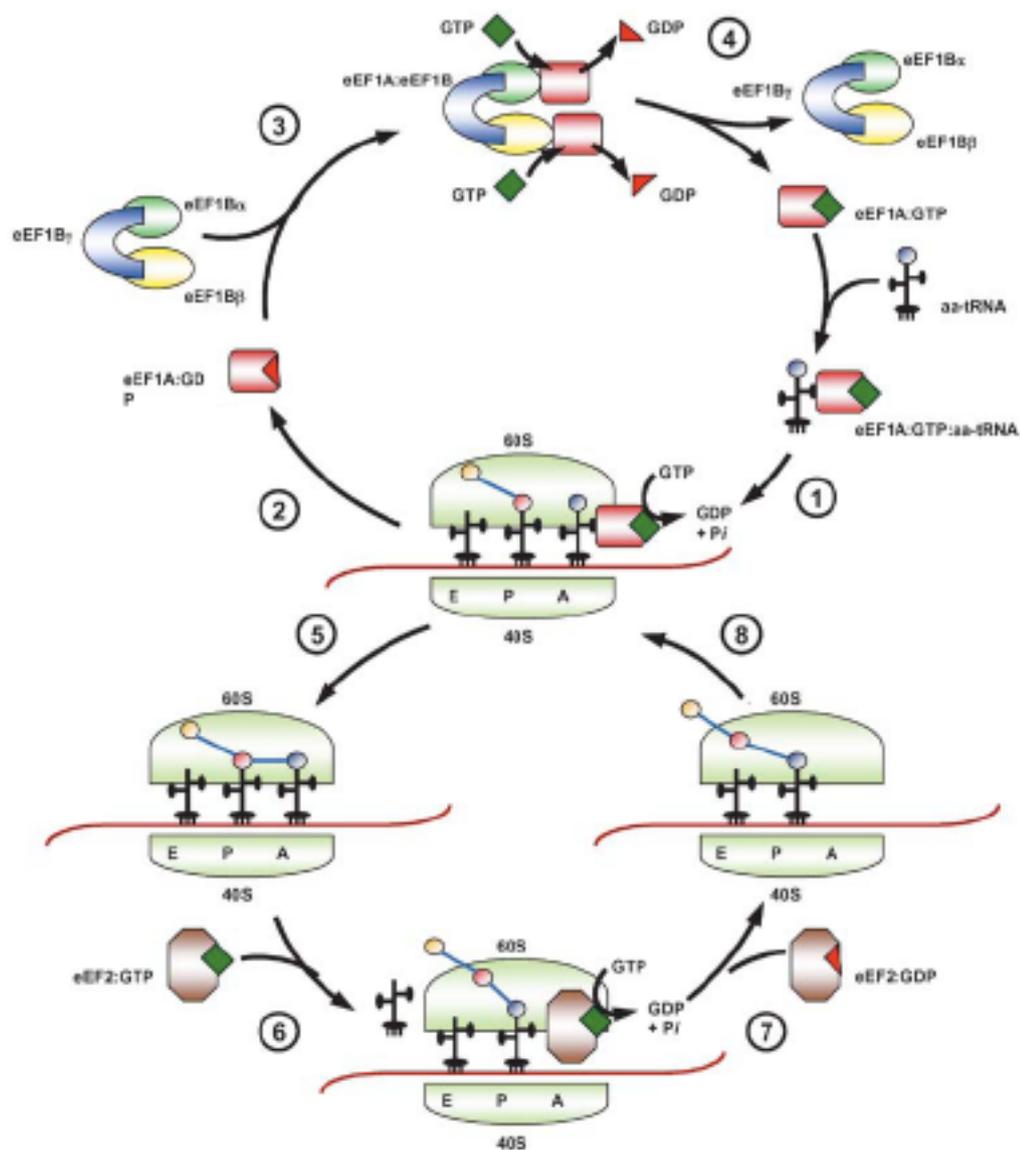
## 1.4 Il fattore di elongazione eucariotico eEF1A

eEF1A è una proteina ubiquitaria altamente espressa all'interno della cellula e presenta un alto grado di conservazione durante l'evoluzione.

Negli eucarioti di livello inferiore, sono state identificate un elevato numero di isoforme, diversamente regolate durante lo sviluppo degli organismi. Nello *Xenopus laevis* sono stati

identificati due geni che codificano per eEF1A, EF-1 $\alpha$ O, prevalentemente espresso negli oociti, ed EF-1 $\alpha$ S la cui espressione viene attivata a partire dall'oogenesi and onwards. Inoltre, è stata identificata anche una proteina simile all'EF-1 $\alpha$ , denominata 42Sp50. L'isoforma specifica identificata negli oociti è stata purificata e presenta un'attività molto simile a quella che l'eEF1A esercita a partire dall'Artemia arrivando fino al coniglio, anche se la capacità di legare nucleotidi viene alterata.

Negli eucarioti superiori sono stati identificati due geni distinti che codificano per due distinte isoforme, eEF1A1 ed eEF1A2: queste due isoforme presentano un'omologia superiore al 90% sia a livello nucleotidico che aminoacidico e svolgono essenzialmente la stessa funzione durante la sintesi proteica (Fig. 9): sono proteine che legano il GTP e la loro funzione è quella di mediare il trasferimento dell'aminoacil tRNA sul sito A del ribosoma; a seguito del riconoscimento codone-anticodone, il GTP viene idrolizzato e il complesso inattivo eEF1A-GTP viene rilasciato. In seguito la proteina eEF1B provvederà a rigenerare il complesso attivo sostituendo il GDP con GTP (93).



**Figura 8 - La fase di elongazione della sintesi proteica (93).**

Tuttavia, le due isoforme presentano una differente distribuzione tissutale: mentre la localizzazione di eEF1A1 è ubiquitaria, eEF1A2 viene espresso specificamente solo nel tessuto muscolare scheletrico, tessuto cardiaco e aorta e nel cervello (94).

Nei mammiferi sono inoltre presenti parecchi geni che codificano per eEF1A, ma solo i geni *EEF1A1* ed *EEF1A2* sono trascrizionalmente attivi; per il resto, si tratta di retrospseudogeni originati da *EEF1A1*. Tuttavia i due geni principali presentano una diversa mappatura cromosomica nel genoma umano: *EEF1A1* è stato mappato sul cromosoma 6q14, mentre *EEF1A2* sul 20q13.3 (95).

### 1.4.1 eEF1A e proliferazione cellulare

Le cellule che sono coltivate in vitro cessano di proliferare in assenza di fattori di crescita, quali il siero ed entrano in una fase di quiescenza reversibile fintanto che non sono somministrati nuovamente i fattori di crescita. Si è visto che proprio in questo momento, i livelli di espressione di eEF1A e il tasso di elongazione aumentano repentinamente.

Anche l'ormone insulina induce uno stimolo mitogenico, agendo sia sulla progressione del ciclo cellulare che sulla sintesi proteica: una cellula può attivare la sintesi proteica solo dopo 8 minuti dallo stimolo insulinico e in questo intervallo il tasso di elongazione raddoppia. È stato ipotizzato quindi che l'insulina possa avere non solo un ruolo nella proliferazione cellulare, ma proprio una funzione regolatoria, infatti, come è già stato descritto, questo ormone può attivare diverse proteine chinasi, fra cui S6k, la quale può fosforilare eEF1A su residui non identificati. L'attività di eEF1A, a seguito di questa fosforilazione, aumenta di 2-3 volte in vitro, sebbene il meccanismo non sia stato ancora chiarito.

Anche gli esteri del forbolo sono dei potenti mitogeni e attivatori della sintesi proteica: il PMA è in grado di far duplicare il tasso di elongazione e di attivare anche membri della famiglia delle PKC. È stato dimostrato che PKC $\gamma$  può fosforilare eEF1A su uno specifico residuo, la Thr<sup>431</sup>, aumenta lo scambio GDP-GTP probabilmente stimolando l'attività di eEF1B (93).

### 1.4.2 eEF1A e signaling lipidico

Una delle prime evidenze di un coinvolgimento di eEF1A nel signaling lipidico proviene da studi condotti su una proteina omologa purificata dalle carote, PIK-A49, in grado di legare e attivare l'enzima fosfatidilinositolo 4-kinasi (PI4K). Nello specifico, questo enzima è una chinasi lipidica in grado di fosforilare il carbonio D4 dell'anello inositolo del fosfatidilinositolo producendo fosfatidilinositolo 4-fosfato (PI4P). Il PI4P è il precursore del PIP<sub>2</sub> e PIP<sub>3</sub>.

Sono state identificate quattro isoforme di PI4K, PI4K III $\alpha$ , PI4K III $\beta$  e PI4K II. Il gruppo di Lee ha dimostrato che eEF1A2 è in grado di legare e stimolare l'attività chinastica di

PI4K III $\beta$  in cellule umane e di roditore, determinando un aumento dell'attività dell'enzima e della produzione di PI4P cellulare. In cellule umane, il bulk dell'attività della PI4K è associata con le membrane cellulare e nucleare, lisosomi, Golgi e reticolo endoplasmatico.

Tuttavia, non è ancora stato chiarito il meccanismo molecolare attraverso il quale eEF1A2 può attivare la chinasi: è stato proposto che a seguito del legame avvenga una modificazione conformazionale nell'enzima tale da aumentarne l'attività chinasi; questo meccanismo inoltre sembra essere specifico per questo enzima, eEF1A2 infatti non sembra essere un attivatore generale per proteine chinasi lipidiche, suggerendo quindi una specifica funzione del fattore di elongazione in questa fase della cascata del segnale lipidico. Considerate le proprietà trasformanti di eEF1A2 e il suo ruolo come oncogene, è possibile speculare che questo meccanismo possa instaurarsi attraverso l'attivazione di PI4K e la produzione di PI4P: l'aumento di PI4P potrebbe comportare un aumento di PIP<sub>2</sub> e PIP<sub>3</sub>, secondi messaggeri intracellulari coinvolti nell'organizzazione citoscheletrica, traffico vescicolare e proliferazione. In particolare, PIP<sub>3</sub> è un secondo messaggero lipidico che attiva cascate di trasduzione del segnale molto importanti nei processi ontogenetici, tra cui quella diretta dalla proteina chinasi Serina/Treonina Akt. Akt è in grado di regolare l'attività di molti processi coinvolti nell'oncogenesi, fra cui proliferazione, crescita cellulare, apoptosi e rimodellamento dei filamenti di actina. Recentemente, grazie alle tecniche di spettrometria di massa, è stato possibile identificare eEF1A come un nuovo possibile partner di legame di Akt2 associata a Rho, ed inoltre si è visto che l'espressione di eEF1A2 aumenta l'abbondanza di Akt. Considerato che l'overespressione di Akt2 aumenta l'invasività tumorale e i processi metastatizzanti nei tumori umani al seno e all'ovaio secondo un meccanismo PI3K-dipendente, è possibile ipotizzare che il meccanismo tramite il quale eEF1A possa attivare Akt sia dipendente dalla cascata di trasduzione del segnale lipidica (96, 97).

In un articolo molto recente Lee e collaboratori hanno dimostrato che eEF1A2 regola la formazione dei filopodi (vedi paragrafo citoscheletro) attraverso l'attivazione di Cdc42 e l'aumento di PIP<sub>2</sub>, mediante il legame e l'attivazione di PI4K III $\beta$ . Gli autori hanno osservato infatti che l'aumento di espressione di eEF1A2 determina la produzione di un pool citosolico e legato alla membrana plasmatica di PIP<sub>2</sub>, inoltre che esprimendo una forma mutata di eEF1A2 incapace di legare PI4K III $\beta$ , non si ha né aumento di PIP<sub>2</sub> né formazione di filopodi (98).

E' stata anche dimostrata la capacità dell'isoforma A2 di interagire con diverse molecole che intervengono nei processi di segnalazione cellulare: per esempio, può interagire con il dominio SH2 di Grb2, RasGAP, Shc, con la porzione C-terminale di Shp2 e con il dominio SH3 di Crk, Fgr, Fyn e della fosfolipasi C-gamma1. Di particolare interesse è l'associazione tra eEF1A2 e Shp2, in quanto Shp2 può attivare Ras e quindi avviare le cascate di trasduzione del segnale PI3K e MAPK – dipendenti. Anche l'interazione con RasGAP può avere importanti significati, da un lato RasGAP può agire attivando eEF1A2 avendo una funzione GTPasica, dall'altro lato eEF1A2 può influenzare RasGAP modulando quindi l'attivazione di Ras. Crk è coinvolto nella cascata di trasduzione MAPK e svolge un ruolo nella riorganizzazione dell'actina citoscheletrica e nella cascata di trasduzione indotta dal recettore dell'insulina. Anche le proteine tirosina-chinasi Fgr e Fyn sono coinvolte nelle cascate di traduzione MAPK/ERK e del recettore dell'insulina, ma partecipano al controllo della fase iniziale della sintesi proteica (99).

### **1.4.3 eEF1A e cancro**

Tatsuka e colleghi furono i primi ad ipotizzare un ruolo dei fattori implicati nel meccanismo della sintesi proteica alla trasformazione neoplastica. Il primo lavoro in cui si stabilisce un ruolo di eEF1A nell'oncogenesi umana è stato pubblicato dal gruppo di Fisher: identificarono questo fattore di elongazione come differenzialmente espresso in cellule primarie di carcinoma prostatico.

Più recentemente, il gruppo di Lee ha pubblicato diversi lavori in cui si stabilisce il ruolo di eEF1A2 come oncogene. Per poter essere considerato oncogene, un gene deve possedere certe caratteristiche che non sono assolute ma generalmente accettate: deve essere iperattivato o iperespresso in cellule tumorali umane primarie e deve avere la capacità di “trasformare” cellule di roditore *in vitro*. Capacità trasformante significa che l'espressione di questo gene induce i fibroblasti a crescere in sospensione e non in maniera aderente come normalmente avviene e a formare strutture simili a dome chiamate foci.

In particolare, Lee e collaboratori hanno osservato che eEF1A2 è overespresso in circa il 30% dei tumori primari all'ovaio. eEF1A2 è mappato sul cromosoma 20q13, un locus che si è visto essere aumentato in numero di copie nel 30% dei tumori al seno e all'ovaio e in entrambi i tipi di cancro questo correla con una prognosi clinica sfavorevole e con un

aumento dell'aggressività e invasività tumorale. Quattro geni mappati sul cromosoma 20q12-13 sono considerati probabili promotori dello sviluppo dei tumori ovarici: ZNF217, PTP1B, STK15/BTAK e MYBL2. Tra questi, ZNF217 codifica per un fattore di trascrizione che induce immortalizzazione in cellule epiteliali mammarie umane. In un lavoro molto recente, è stato riportato che ZNF217, che è un repressore trascrizionale, è in grado di aumentare l'espressione di eEF1A2; inoltre si è visto che l'overespressione di questo fattore di elongazione in cellule non tumorigeniche precursori del tumore all'ovaio, induce un effetto neoplastico e media l'effetto tumorigenico di ZNF217 (100).

Data l'omologia fra le due isoforme di eEF1A si è pensato che potesse essere probabile anche un ruolo dell'isoforma A1 nei processi tumorali, ma non sembrano esserci connessioni, infatti se overespresso non promuove la malignità tumorale e da solo non ha capacità trasformanti in cellule in coltura. Per contro, però è stato riportato che eEF1A1 è overespresso in melanomi, tumori del pancreas, seno, polmone, prostata e colon ed è presente in cellule di adenocarcinoma metastatico di ratto.

E' stato anche riportato che eEF1A2 è overespresso in circa il 50% dei tumori al seno e al polmone, in particolare in quest'ultimo è associato con prognosi sfavorevole.

Si è visto che cellule che esprimono eEF1A2 presentano un'elevata invasività, il che suggerisce un ruolo di eEF1A2 nei processi metastatici; a sostegno di ciò, pazienti affetti da cancro al polmone e che presentano alti livelli d'espressione di eEF1A2, hanno una ridotta probabilità di sopravvivenza paragonati ai pazienti che non esprimono eEF1A2.

Nel caso del cancro al seno, invece, è stato stabilito un significato prognostico di eEF1A2, per cui alti livelli d'espressione di eEF1A2 correlano con un aumento della probabilità di sopravvivenza a 20 anni.

Considerato il ruolo di eEF1A2 nel signaling lipidico, è possibile arguire diverse speculazioni: eEF1A2 può attivare diversi processi oncogenici, come il signaling di Akt e quindi promuovere la migrazione cellulare, in questo caso può essere considerato più come oncogene meno pericoloso di altri che come fattore prognostico; infatti, l'aumento della motilità può precludere la capacità delle cellule metastatizzanti che si separano dal tumore primario, di colonizzare siti secondari. In alternativa, eEF1A2 potrebbe interferire con processi in modo tale da diminuire la mortalità dei pazienti: per esempio, promuovendo la proliferazione cellulare così da rendere il tumore più suscettibile alla chemioterapia, oppure il differenziamento, portando il tumore in uno stadio meno maligno.

Come detto nel paragrafo precedente, eEF1A è un partner di legame di Akt2. E' stato visto che l'overespressione di Akt2 aumenta le capacità invasive e metastatizzanti del tumore al seno umano e all'ovaio mediante la cascata di trasduzione del segnale PI3K-dipendente (93, 97, 101, 102).

#### **1.4.4 eEF1A e citoscheletro**

Il citoscheletro di una cellula eucariotica è costituito da lunghi polimeri di actina, chiamati filamenti, e lunghi polimeri di tubulina, i microtubuli. Queste strutture conferiscono integrità strutturale e regolano la motilità cellulare e l'endocitosi.

Si è visto che eEF1A, in differenti specie e generi, può interagire con il citoscheletro legando i filamenti di actina in vitro: questa associazione inibisce la depolimerizzazione dell'actina ma può anche promuovere, se la concentrazione di eEF1A è molto alta, l'assemblamento di monomeri di actina per formare i filamenti. In entrambi i casi, l'effetto finale è un aumento della lunghezza dei filamenti che contengono actina.

eEF1A può anche promuovere il bundling di fibre di actina per formare strutture simili a gel; viceversa, anche l'actina può influenzare l'attività di eEF1A legandosi alla proteina e diminuendo la sua capacità di interagire con il tRNA-aa.

Sembra quindi che l'associazione tra eEF1A e il citoscheletro non avvenga per facilitare la sintesi proteica, è stato ipotizzato quindi che possa invece promuovere il rilascio dal citoscheletro, di depositi di fattori di elongazione al fine di aumentare rapidamente il processo traduzionale.

Ci sono inoltre lavori sperimentali discordanti per quanto concerne il ruolo di eEF1A sui microtubuli: alcuni hanno osservato depolimerizzazione a seguito della microiniezione di eEF1a umano all'interno della cellula, altri invece hanno osservato che eEF1A stabilizza i microtubuli.

Lee e collaboratori hanno osservato che l'espressione di eEF1A2 stimola la formazione di filopodi nei roditori e in cellule di mammifero, in particolare questo rende le cellule tumorali più migratorie e invasive in vitro. I filopodi, infatti, sono bundled di filamenti paralleli di actina che protrudono all'esterno della membrana cellulare e svolgono ruoli fondamentali nella migrazione cellulare, ma anche nei processi di invasione metastatica.

Al di là di ogni evidenza sperimentale, resta ancora da chiarire completamente il significato fisiologico dell'interazione tra eEF1A e citoscheletro (98, 103).

### 1.4.5 eEF1A ed apoptosi

La morte cellulare programmata o apoptosi è un tipo di morte cellulare geneticamente determinata, essenziale per lo sviluppo e l'omeostasi cellulare negli organismi multicellulari. Sono stati identificati parecchi geni che prendono parte a questo meccanismo e quello che è emerso è che esistono meccanismi multipli dalla cui integrazione e attivazione prende il via il segnale che porta alla morte cellulare. La via di attivazione più diretta coinvolge recettori che si trovano sulla superficie cellulare che a loro volta attivano proteine note con il nome di caspasi. Un secondo meccanismo, interno alla cellula, coinvolge proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2. Ci sono poi pattern molto specifici a seconda della localizzazione cellulare, per cui vengono attivati percorsi che coinvolgono diverse molecole segnale per promuovere il meccanismo apoptotico, per esempio, nel reticolo endoplasmatico (perturbazione dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$ ) e nel nucleo (attivazione di p53 in seguito a danno al DNA) (104).

Le prime evidenze sul coinvolgimento di eEF1A nel processo apoptotico derivano da studi sul modello murino *Wasted*. Si tratta di una mutazione recessiva spontanea che comporta immunodeficienza, anomalie neurali, atrofia muscolare e morte entro 30 giorni dalla nascita (105, 106) Le cellule che derivano da questi animali presentano un'alta mortalità cellulare e apoptosi in seguito a danno indotto al DNA. Il fenotipo *Wasted* è il risultato di una delezione nel promotore dell'ATM kinasi e del primo esone del gene *EEF1A2* omologo a quello umano.

I topi *Wasted* presentano un'elevata apoptosi nel timo e negli organi linfoidei, in assenza di eEF1A2, il che suggerisce una funzione di questo fattore di elongazione, nell'inibizione dell'apoptosi. Talapatra e collaboratori hanno identificato EEF1A1 come uno dei geni con un ruolo anti-apoptotico a seguito di somministrazione di Il-3; altri hanno osservato che l'espressione di eEF1A2 protegge le cellule muscolari da apoptosi mediata dalla caspasi 3. Inoltre, è stata recentemente riportata un'associazione tra l'acquisizione di farmacoresistenza al cisplatino, chemioterapico utilizzato nel trattamento di diverse tipologie tumorali, e l'aumento di espressione di eEF1A1.

Come già detto, c'è un aumento di espressione di eEF1A in alcuni tipi di tumori umani e si potrebbe speculare che questo aumento contribuisca all'acquisizione di farmaco-resistenza chemioterapica, specialmente nel tumore all'ovaio, e riduca la probabilità di sopravvivenza dei pazienti (93).

In generale comunque, sembra che eEF1A1 abbia un ruolo pro-apoptotico in linee cellulari eritroleucemiche e di cardiomiociti, mentre eEF1A2 sembra preservare dall'apoptosi i miotubi differenziati in cellule muscolari scheletriche e cellule emopoietiche. Lamberti e collaboratori hanno dimostrato che, in cellule di cancro al polmone, si osserva una upregolazione intracellulare di eEF1A mediata da IFN $\alpha$  e dovuta ad un aumento dei livelli di fosforilazione su residui serinici e treoninici del fattore di elongazione. Sembra che C-Raf sia responsabile della fosforilazione di eEF1A, in questo modo preservandolo da degradazione mediata da ubiquitina-proteasoma e mantenendone la funzione anti-apoptotica promuovendo così la sopravvivenza cellulare. Questa ipotesi deriva dal fatto che, nello stesso modello cellulare, IFN $\alpha$  induce un aumento del livello e dell'attività del recettore dell'EGF e della cascata di trasduzione del segnale Ras-C-Raf-Mek1-Erk 1/2, che svolge un ruolo prevalentemente anti-apoptotico (107).

Wang e collaboratori hanno dimostrato un ruolo anti-apoptotico esercitato da eEF1A2 in miotubi differenziati in coltura. Nel differenziamento muscolare scheletrico, si osserva uno *switch* tra le due isoforme del fattore di elongazione 1A: mentre l'isoforma 1 è espressa nello stadio embrionale e durante lo sviluppo post-natale precoce, l'isoforma 2 è l'unica presente nel muscolo adulto e, in generale, in tessuti costituiti da cellule completamente differenziate. Il gruppo di Wang ha dimostrato che l'espressione di eEF1A2 viene attivata durante il differenziamento miogenico e che, in linee cellulari muscolari C2C12 ed L6 indotte all'apoptosi per deprivazione di siero, eEF1A2 scompare e viene rimpiazzato dall'omologo eEF1A1. Utilizzando un sistema di overespressione adenovirale, gli autori hanno dimostrato che eEF1A2 esercita un ruolo anti-apoptotico mentre l'isoforma 1 un ruolo pro-apoptotico in miotubi differenziati (108).

## Capitolo 2    Scopo della ricerca

Studi condotti sulla linea cellulare di mioblasti murini C2C12, un modello riconosciuto e riproducibile del processo di miogenesi, hanno evidenziato che durante il differenziamento indotto dalla stimolazione con insulina si osserva, oltre all'aumento dell'espressione di proteine muscolo-specifiche, come la miogenina, un marcato incremento dell'espressione della fosfolipasi C- $\beta$ 1.

La PI-PLC  $\beta$ 1 costituisce l'isoforma della PLC maggiormente rappresentata a livello nucleare, dove è in grado di attivare un ciclo dei fosfoinositidi distinto da quello della membrana plasmatica. In generale, le PLC catalizzano l'idrolisi del fosfatidil-inositolo 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) con produzione di diacilglicerolo (DAG) e di inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>), che a loro volta agiscono come secondi messaggeri, andando ad attivare bersagli specifici coinvolti nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare.

Non sono stati ancora del tutto identificati gli effettori molecolari che sono attivati a valle della cascata di trasduzione indotta dalla PI-PLC  $\beta$ 1 e, in particolare, non sono del tutto noti i bersagli specifici della fosforilazione da parte di cPKC nel processo di differenziamento muscolare. E' noto inoltre che la fosforilazione è uno dei meccanismi più importanti attraverso il quale una cellula regola le sue funzioni primarie e un fondamentale meccanismo di comunicazione fra i diversi compartimenti cellulari al fine di attivare o reprimere una via di segnalazione che solitamente porta alla regolazione della trascrizione genica o della sintesi proteica.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di identificare, mediante un approccio proteomico, nuove proteine substrato di fosforilazione da parte di PKC convenzionali, poichè sono il gruppo di chinasi che viene attivato maggiormente dal DAG nucleare prodotto dall'idrolisi del PIP<sub>2</sub> da parte della PI-PLC  $\beta$ 1. In secondo luogo, l'obiettivo è stato anche quello di tentare di chiarire i meccanismi di regolazione e attivazione dei nuovi substrati identificati. A tal fine, si è scelto un approccio di tipo proteomico attraverso il quale, grazie all'utilizzo di un anticorpo disegnato specificamente per riconoscere una sequenza presente nelle proteine fosforilate da cPKC, è stato possibile identificare nuovi substrati avvalendosi delle avanzate tecnologie di spettrometria di massa.

## Capitolo 3 Materiali e metodi

### 3.1 Reagenti e anticorpi

Gli inibitori delle proteasi sono della ditta Pierce (Rockford, USA), gli inibitori delle fosfatasi sono della ditta Thermo Scientific (Rockford, USA), mentre la benzoni è della ditta Novagen (Madison, USA).

La nitrocellulosa è della ditta Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La concentrazione della proteina è stata dosata con il Bradford protein assay kit della ditta Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La tripsina metilata per la digestione triptica (Sequencing grade modified trypsin) è della ditta Promega (Madison, USA). Tutti gli altri prodotti sono della ditta Sigma (St. Louis, MO, USA) se non diversamente specificato.

Per la ricerca di nuovi substrati fosforilati da cPKC, è stato utilizzato un anticorpo commerciale, *l'antiphospho PKC substrate*, prodotto in coniglio (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Questo anticorpo riconosce una sequenza aminoacidica specifica contenente una serina fosforilata (posizione 0), un'arginina o una lisina in posizione +2 e -2 e un aminoacido idrofobico in posizione +1.

Per le analisi in immunoblotting e microscopia a fluorescenza sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anticorpi policlonali (IgG1) anti-PKC $\alpha$  (clone C-20), PKC  $\beta$ I (clone C-16), PKC $\beta$ II (clone C-18), PKC $\gamma$  (clone C-19), istone H3 (clone FL-136), EF1A (clone H-300) e PLC $\beta$ I, prodotti in coniglio (Santa Cruz Biotechnology, La Jolla, CA); anticorpo monoclonale murino anti-C23 / nucleolina (MS-3 clone) (Santa Cruz Biotechnology, La Jolla, CA); anticorpo monoclonale murino anti-PLC  $\beta$ 1 (Upstate); anticorpo monoclonale anti- $\beta$ -tubulina (Sigma); anticorpo monoclonale anti-eEF1A2 prodotto in coniglio; anticorpo monoclonale anti-Lamina B1 (Chemicon International, Temecula, CA, USA).

### 3.2 Colture cellulari e induzione del differenziamento

La linea cellulare di mioblasti murini C2C12 è stata coltivata in terreno DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) ad alto contenuto di glucosio (Euroclone)

contenente il 10% di siero fetale bovino (*Foetal Bovine Serum*, FBS, Euroclone), questo terreno è definito terreno di crescita (*Growth Medium*, GM). Per indurre il processo di differenziamento miogenico, quando le cellule hanno raggiunto l'80% di confluenza, il terreno GM è stato sostituito con terreno di differenziamento (*Differentiation Medium*, DM), che può essere costituito da DMEM privo di siero contenente insulina 100 nM (Sigma-Aldrich) oppure da DMEM contenente il 2% di FBS. In base all'esperimento, le cellule sono state mantenute in DM per diversi tempi.

### **3.3 Purificazione di nuclei da cellule C2C12**

Le cellule sono state tripsinizzate e centrifugate a 1700 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato lavato una volta con tampone fosfato (PBS) pH 7.4. Il pellet pari a circa  $5 \times 10^6$  cellule, è stato risospeso in 500  $\mu$ L di tampone per l'isolamento nucleare (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP-40, 10mM  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.5mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml aprotinina, 10 $\mu$ g/ml leupeptina/ml, 10 $\mu$ g/ml inibitore della tripsina, 15 $\mu$ g/ml inibitori delle calpaine I e II, 5mM NaF e 10 $\mu$ g/ml inibitori delle fosfatasi) e incubato per 3 minuti in ghiaccio. Sono stati aggiunti 500  $\mu$ L di acqua bidistillata, lasciato in incubazione per 3 minuti in ghiaccio e quindi la sospensione è stata fatta passare in siringa con ago 23 G. I nuclei così ottenuti sono stati centrifugati a 400 x g per 6 minuti a 4° C, lavati una volta con 500  $\mu$ L di tampone di lavaggio (10mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, con l'aggiunta di inibitori delle proteasi come descritto sopra). La purezza dell'isolamento di nuclei è stata verificata tramite immunoblotting con anticorpo anti- $\beta$ -tubulina.

### **3.4 Purificazione di nucleoli da cellule C2C12**

I nucleoli sono stati ottenuti utilizzando un protocollo descritto da Muramatsu e collaboratori: le cellule sono state lisate con 5 ml di Buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DTT, 1 $\mu$ g/ml aprotinina, 1 $\mu$ g/ml leupeptina, 10 $\mu$ g/ml inibitore della tripsina, 15  $\mu$ g/ml inibitori delle calpaine I e II e 10 $\mu$ g/ml inibitori delle

fosfatasi), incubate per 5 minuti in ghiaccio ed infine la sospensione è stata passata in siringa con ago 23 G per 8 volte per rompere la membrana cellulare. I nuclei così ottenuti sono stati centrifugati a 218 x g per 5 minuti a 4° C. Il pellet che si ottiene è costituito da nuclei non totalmente purificati, quindi si è proceduto a risospendere con 3 ml di soluzione S1 (0.25 M saccarosio, 10m MgCl<sub>2</sub>), a cui sono stati aggiunti 3 ml di soluzione S2 (0.35 M saccarosio, 0,5 m MgCl<sub>2</sub>), lasciato che le due soluzioni a diverso gradiente di saccarosio stratificassero, infine si è centrifugato a 1430 x g per 5 minuti a 4°C. I nuclei così purificati sono stati risospesi con 3 ml di soluzione S2, centrifugati a 3000 x g per 10 minuti a 4° C e quindi si è sonicato la sospensione utilizzando un sonicatore a punta (Ultrasonic 2000, Artek), in bagno di ghiaccio per sei cicli da 10 secondi ciascuno a potenza massima. Si sono aggiunti quindi 3 ml di soluzione S3 (0.88 M saccarosio, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>), lasciato stratificare per gradiente di saccarosio e centrifugato a 3000 x g per 10 minuti. Per ottenere un preparato nucleolare purificato, il pellet è stato rispeso con 0.5 ml di soluzione S2 e centrifugato a 1430 x g per 5 minuti. La purezza dell'isolamento dei nucleoli è stata verificata tramite immunoblotting con anticorpo anti-lamina B1.

### **3.5 Solubilizzazione delle frazioni cellulari e dosaggio del contenuto proteico.**

Le diverse frazioni cellulari sono state solubilizzate in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 1% NP-40, 140 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.1% sodio deossicolato, 50 mM NaF, e un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma) e sono state lasciate in ghiaccio per 30 minuti, vortexando di tanto in tanto. Per rimuovere il materiale insolubile, i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C ed è stato recuperato il surnatante.

La concentrazione proteica dei diversi preparati è stata determinata attraverso analisi allo spettrofotometro utilizzando il "Bradford protein assay" (Bio-Rad). In breve, 2 µl di ogni campione sono stati diluiti in 800 µl di acqua distillata, mentre per il campione di riferimento sono stati utilizzati 2 µl di RIPA sempre diluiti in 800 µl di acqua. Ad ogni campione, preparato in triplicato, sono stati aggiunti 200 µl di colorante Bradford. La lettura dell'assorbanza a 595 nm è stata misurata allo spettrofotometro e la concentrazione

proteica è stata determinata interpolando i valori così ottenuti con quelli di una curva standard di BSA.

### **3.6 Immunoprecipitazione**

1 mg di lisato ottenuto come descritto sopra è stato pre-incubato con 10  $\mu$ L di proteina A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology) per 30 minuti a 4°C per rimuovere i legami aspecifici. La sospensione è stata centrifugata brevemente a massima velocità. Il surnatante è stato incubato con l'anticorpo primario e lasciato in agitazione 12 ore a 4°C. Per recuperare gli immunocomplessi, sono stati aggiunti 20 $\mu$ L di proteina A/G agarose, si è lasciato in incubazione per 1 ora in agitazione a 4°C, quindi la sospensione è stata centrifugata brevemente a massima velocità. Il pellet è stato lavato 4 volte in tampone di lavaggio (25 mM Tris/saccarosio, 1% Np40).

### **3.7 SDS-PAGE e analisi mediante immunoblotting**

50  $\mu$ g di ogni campione sono stati risospesi in *Laemli sample buffer* e denaturati a 100°C per 5 minuti. Le proteine sono state separate mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE). La concentrazione dei gel di poliacrilammide è diversa in base al peso delle proteine da analizzare, in particolare sono stati utilizzati gel al 12% per l'identificazione di fosfosubstrati di cPKC, per analizzare invece l'espressione di eEF1A2 e l'interazione con cPKC sono stati utilizzati gel al 10%.

Negli esperimenti di immunoprecipitazione con anticorpo anti-fosfosubstrato, le proteine presenti nel gel sono state visualizzate mediante colorazione con Blu Coomassie G-250 colloidale (Sigma). Il gel è stato colorato per 12 ore a temperatura ambiente e quindi l'eccesso di colorante è stato rimosso con lavaggi in 25% metanolo in acqua; si è proceduto poi al taglio delle bande d'interesse per l'identificazione in spettrometria di massa.

Negli esperimenti di immunoblotting, le proteine separate mediante corsa elettroforetica sono state trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa applicando un voltaggio di

100 V per 1 ora a 4°C. L'avvenuto trasferimento delle proteine è stato evidenziato con una colorazione reversibile con Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich). La membrana di nitrocellulosa è stata saturata con 2% BSA e 3% di latte scremato in polvere in PBS (Phosphate Buffered Saline) + 0.1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich), per 30 minuti a temperatura ambiente. L'incubazione con l'anticorpo primario è stata effettuata *overnight* a 4°C. L'incubazione con l'anticorpo secondario, coniugato con perossidasi di rafano, diluito 1:10000 in PBS + 0.1 % Tween 20, è avvenuta a temperatura ambiente per 60 minuti. Infine la presenza delle proteine d'interesse è stata rivelata attraverso reazione di chemiluminescenza (SuperSignalWest Pico chemiluminescent reagent, Pierce), visualizzata e analizzata mediante Kodak Image Station 2000R.

### **3.8 Immunofluorescenza su preparati nucleari “*in situ*”**

Cellule C2C12 sono state fatte crescere su vetrini copri-oggetto, lavate con tampone salino PBS (Sigma-Aldrich) e incubate con tampone di permeabilizzazione citoscheletrica (10 mM Pipes, pH 6.8, 300 mM saccarosio, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 2 mM complesso vanadil ribonucleoside (VRC), 1.0 mM PMSF e cocktail di inibitori delle proteasi) per 5 minuti in ghiaccio. I vetrini sono stati lavati con PBS per rimuovere i frammenti citoscheletrici e i nuclei così ottenuti sono stati fissati per 10 minuti con paraformaldeide 4% in PBS a temperatura ambiente. Sono stati poi incubati con 3% BSA in PBS per 1 ora a temperatura ambiente quindi incubati con l'anticorpo primario per 3 ore a 4° C in PBS/3% BSA. Sono stati fatti diversi lavaggi in PBS, quindi si è proceduto ad incubare con l'anticorpo secondario coniugato a molecole fluorescenti (1:500) per 1 ora a temperatura ambiente nello stesso tampone utilizzato per l'anticorpo primario.

I campioni sono stati poi nuovamente lavati in PBS e montati su vetrini utilizzando un reagente anti-fading in glicerolo. Infine i vetrini sono stati osservati e fotografati al microscopio a fluorescenza Nikon E600. Le immagini ottenute sono state acquisite e analizzate con il software dedicato NIS-element BR 2.20.

### 3.9 Analisi in spettrometria di massa LC-MS/MS

Le bande d'interesse sono state rimosse manualmente dal gel colorato Blu Coomassie G-250 colloidale. Le proteine sono state quindi lavate con 100mM di ammonio bicarbonato (pH 8) e 50% ACN fino a completa decolorazione del gel, quindi ridotte e alchilate con una soluzione, rispettivamente, 10mM DTT e 55 mM iodoacetamide, infine digerite con tripsina (Promega, Madison, WI, USA) ad una temperatura costante di 37 °C *overnight*. Alla fine dell'incubazione, la tripsina è stata neutralizzata aggiungendo acidotrifluoroacetico (TFA) e i peptidi sono stati estratti usando una soluzione 50% ACN e 0,1% TFA, per tre volte consecutive. In ciascuna estrazione i campioni sono stati posti in agitazione per 5 minuti, seguito da centrifugazione e rimozione del surnatante. Il surnatante di partenza e quelli ottenuti dalle diverse estrazioni sono stati riuniti e asciugati fino ad ottenere un volume di circa 10 µL. Di questi, 6 µL sono stati iniettati in cromatografia capillare in fase liquida (CapLC system, Micromass, Waters) accoppiata con nano-ESI-Q-TOF (Micromass, Waters).

I peptidi si legano prima ad una colonna a fase inversa C18 da 5 µm e lavati per rimuovere i contaminanti (Waters Nanoease Atlantis Trap Column). La separazione analitica avviene con una seconda colonna sempre a fase inversa di dimensioni 75 µmX100mm (Nanoease Atlantis Column, Waters), utilizzando un gradiente di eluizione che prevede il passaggio da 95% di buffer A (0.1 % acido formico in 5% ACN) al 50% di buffer B (0.1 % acido formico in 95% ACN) in 35 minuti.

Lo spettrometro di massa è programmato per eseguire una prima fase di scansione di tutti i peptidi che sono stati ionizzati dalla sorgente ESI in modalità MS con un rapporto massa/carica ( $m/z$ ) di acquisizione da 400 a 1700 Da/e; in seguito, i picchi che presentano intensità maggiore vengono selezionati come precursori e ulteriormente frammentati nella cella di collisione, utilizzando quindi la modalità tandem MS/MS con un rapporto  $m/z$  di acquisizione da 70 a 1700 Da/e. La prima fase di scansione rappresenta un'analisi solo qualitativa (scanning) dei frammenti presenti, con l'analisi MS/MS è possibile determinare quantitativamente il peso molecolare del peptide analizzato.

Gli spettri di massa ottenuti sono stati analizzati con il programma Mascot associato al database NCBI, per ottenere la sequenza peptidica. Si è considerata una tolleranza di 50 ppm come accuratezza per la massa dei peptidi e di 0.2 Da per i frammenti. La ricerca è stata condotta considerando al massimo la presenza di un sito non riconosciuto, quindi non

clivato dalla tripsina, e le modificazioni post-traduzionali considerate sono state la carbamidometilazione delle cisteine, dovuta alla iodoacetamide e l'ossidazione delle metionine.

### **3.10 Mutagenesi sito-specifica ed analisi immunochimica con proteine ricombinanti GST-eEF1A2 e GST-eEF1A2/S53A**

La mutagenesi sito-specifica è stata effettuata sul vettore di espressione pGEX-4T-2 (GE Healthcare) contenente l'intero cDNA codificante per eEF1A2 di topo. In particolare è stata mutata la Ser<sup>53</sup> all'interno della sequenza consenso per la fosforilazione da parte di cPKC utilizzando il kit "QuickChange XL II site-directed mutagenesis kit" (Stratagene), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. La coppia di primer utilizzata per la reazione di mutagenesi è la seguente: *primer I* (5'-GAG ATG GGG AAG GGA GCC TTC AAG TAT GCC TG-3') e *primer II* (3'-CAG GCA TAC TTG AAG GCT CCC TTC CCC ATC TC-5'). La presenza effettiva della mutazione puntiforme nel plasmide risultante è stata verificata attraverso il sequenziamento del vettore.

I nuclei di cellule C2C12 sono stati isolati e lisati come descritto sopra. 1mg di lisato nucleare è stato incubato con 40µl di soluzione contenente *glutathione-sepharose* legato alle proteine ricombinanti GST-eEF1A2 e GST-eEF1A2/S53A. L'incubazione è stata fatta per 2 ore a 4°C. Queste proteine ricombinanti contengono rispettivamente la sequenza aminoacidica che codifica per l'isoforma 2 di eEF1A e la stessa sequenza in cui è stata sostituita la serina in posizione 53 con una alanina. Entrambe queste sequenze sono unite alla sequenza che codifica per la proteina glutathione S-transferasi (GST).

I pellet sono stati poi lavati 3 volte con buffer contenente 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 250 mM saccarosio. Ai complessi di glutathione-sepharose contenenti le proteine ricombinanti sono stati aggiunti 30 µl di *Laemli buffer* e sono stati bolliti per 5 min. I surnatanti sono stati analizzati mediante SDA-PAGE, trasferiti su nitrocellulosa e rivelati con anticorpi.

### **3.11 Trasfezione transiente con il vettore GFP-eEF1A2**

La sequenza di eEF1A2 *wild type* è stata clonata nel vettore di espressione pEGFP-C1 (Clontech) per ottenere la proteina di fusione con la *Green Fluorescent Protein* (GFP), da utilizzare in studi di localizzazione cellulare. Questa sequenza è stata amplificata attraverso PCR utilizzando *primer* contenenti un sito di taglio per l'enzima di restrizione EcoRI. Dopo la digestione dei prodotti di PCR con questo enzima, i frammenti di DNA sono stati ligati nel vettore pEGFP-C1, linearizzato mediante il taglio con EcoRI. L'orientamento corretto dell'inserito è stato verificato attraverso la digestione con l'appropriato enzima di restrizione.

I mioblasti murini C2C12 sono stati trasfettati in modo transiente mediante elettroporazione, utilizzando l'apparato Amaxa Nucleofector (Amaxa), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Per ogni esperimento da 3 a  $10 \times 10^6$  cellule sono state risospese in 100  $\mu$ l della soluzione di elettroporazione contenuta nel kit V (Amaxa). Alla sospensione sono stati aggiunti da 3 a 10  $\mu$ g di vettore, quindi le cellule sono state elettroporate utilizzando il programma B-32 e in seguito seminate su vetrino coprioggetto in piastre a 6 pozzetti. Uno o due giorni dopo la trasfezione, le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza.

### **3.12 Silenziamento della PI-PLC $\beta$ 1 con oligonucleotidi antisenso**

I mioblasti murini C2C12 sono stati trasfettati con una combinazione di due oligonucleotidi antisenso (*RNA interference*) specificamente pre-disegnati per silenziare la PI-PLC  $\beta$ 1, s71792 e 152193 (Ambion, Austin, TX, USA).  $1 \times 10^6$  cellule sono state trasfettate con 100 pmol di siRNA, utilizzando il programma T-20 dell'apparato Amaxa Nucleofector (Amaxa), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice e in seguito seminate in piastre a 6 pozzetti. 12 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state stimulate con insulina e si è proceduto con l'isolamento nucleare e la preparazione di lisati cellulari per immunoblotting.

## Capitolo 4 Risultati

### 4.1 Immunoprecipitazione con anticorpo anti-fosfosubstrato di PKC convenzionali

L'induzione al differenziamento muscolare con insulina in mioblasti in coltura comporta l'attivazione di diverse vie di segnalazione intracellulare e, in particolare, è stato recentemente descritto un ruolo fondamentale della PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare nel differenziamento miogenico terminale. L'aumento di espressione e di attività della PI-PLC  $\beta$ 1 è stato riportato già dopo 24 ore di stimolazione con insulina in nuclei di cellule C2C12 e aumenta ulteriormente nei nuclei di miotubi completamente differenziati.

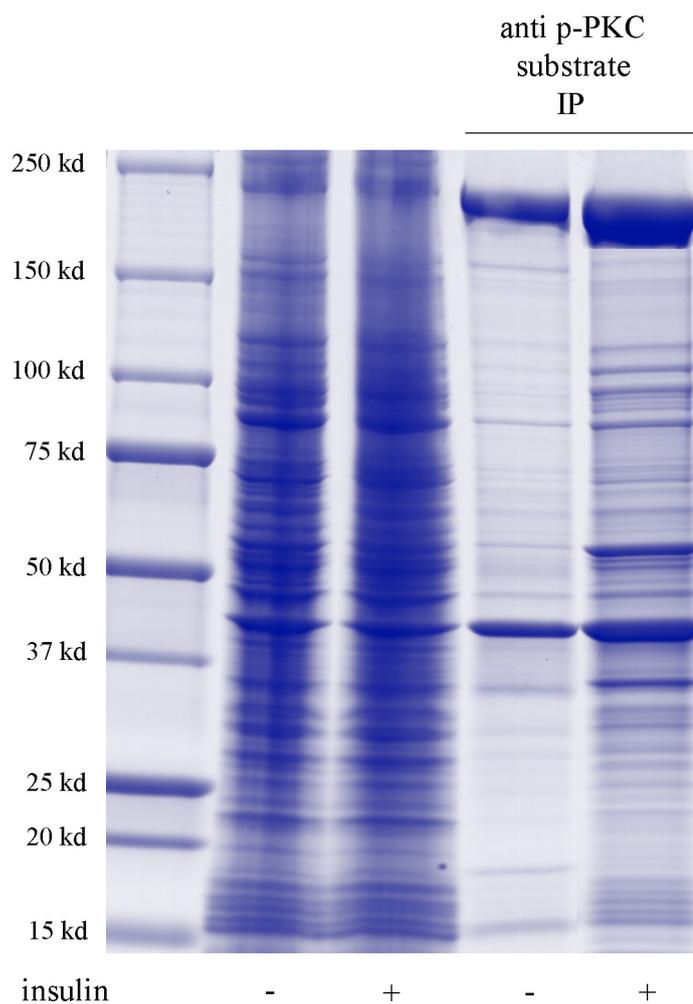
E' noto che l'attività idrolitica di PI-PLC genera due secondi messaggeri fondamentali all'interno della cellula, IP3 e DAG, quest'ultimo attivatore fisiologico di diverse isoforme di PKC. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'attivazione e la fosforilazione a tempi brevi di stimolazione con insulina di nuovi substrati di cPKC, a valle di questa via di segnale indotta dalla PI-PLC  $\beta$  e, successivamente, verificare quali isoforme di PKC siano coinvolte.

I primi esperimenti sono stati condotti su omogenati totali di cellule C2C12 GM (80% di confluenza) e C2C12 DM stimulate a tempi brevi con insulina (1 ora di stimolazione).

1mg di lisato totale è stato immunoprecipitato con anticorpo che riconosce i substrati fosforilati da cPKC (*anti-phospho cPKC substrate*). Questo anticorpo riconosce la serina fosforilata all'interno di un motivo che presenta una lisina o arginina in posizione +2, un residuo idrofobico in posizione +1, e una lisina o arginina in posizione -2 rispetto alla serina fosforilata.

L'immunoprecipitato è stato risolto in SDS-12% PAGE e le proteine presenti sono state colorate con Blu Coomassie colloidale (Fig. 10).

Nella corsia dell'immunoprecipitato da cellule C2C12 stimulate con insulina sono presenti diverse proteine che mostrano un'augmentata espressione rispetto al campione di controllo. Le bande corrispondenti a queste proteine sono state prelevate dal gel per l'analisi in spettrometria di massa. I peptidi originati dalla digestione triptica "in gel" delle proteine



**Figura 9 - SDS-12% PAGE di omogenati totali di C2C12 ed immunoprecipitati con anti-*phospho cPKC substrate*.**

Accanto alla corsia dello standard di peso molecolare sono stati separati 50µg di omogenati totali di C2C12 GM (80% di confluenza) e C2C12 DM (1 ora di stimolazione con insulina). Sono stati separati anche gli immunoprecipitati con anticorpo anti-fosfosubstrato di cPKC su C2C12 GM e C2C12 DM. Le proteine sono state separate in un gel di poliacrilammide al 12%, in seguito colorato con Coomassie colloidale.

Accession	Description	Kd <sub>t</sub>	pI <sub>t</sub>	Mascot score
Q8VDD5	Myosin heavy chain 9	226.4	5.54	3011
P09405	Nucleolin (protein C23)	76.7	4.69	754
P48678	Lamin-A/C	74.2	6.54	514
P26041	Moesin	67.8	6.22	928
<b>P62631</b>	<b>Elongation factor 1-alpha 2</b>	<b>50.5</b>	<b>9.11</b>	<b>522</b>
Q9CWF2	Beta tubulin	49.95	4.78	187
P60710	Beta actin	41.7	5.29	1179
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	32.7	4.69	867
Q9CQ19	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform	19.9	4.80	514
P59999	Actin related protein 2/3 complex subunit 4	19.7	8.53	249
Q60605	Myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	16.9	4.56	485

**Tabella 2 - Tabella riassuntiva delle proteine identificate.**

I peptidi generati dalla digestione triptica delle proteine sono stati identificati in MALDI-TOF/TOF e utilizzati per la ricerca in banca dati SwissProt utilizzando il motore di ricerca Mascot

sono stati analizzati in spettrometria di massa MALDI-TOF/TOF e i dati ottenuti sono stati utilizzati per la ricerca in banca dati attraverso il motore di ricerca Mascot. Le proteine identificate sono elencate in Tabella 2.

Tra le proteine che sono state identificate alcune sono già note in letteratura come substrati di cPKC e presentano il motivo specifico. Solo eEF1A2, però, presenta il motivo ad alta stringenza riconosciuto dall'anticorpo *anti-phospho cPKC substrate*, ovvero con un amminoacido idrofobico in posizione +1 rispetto alla serina fosforilata.

Il motivo che viene riconosciuto dall'anticorpo sull'eEF1A2, presenta la serina fosforilata in posizione 53, circondato da una lisina in posizione +2 e una lisina in posizione -2 e il residuo idrofobico, fenilalanina, in posizione +1 (Fig. 11).

### Eukaryotic elongation factor 1A2

```
1 mgkekthini vvighvdsgk sttghliyk cggidkrtie kfekeaaemg KGS*FKyawvl  
61 dklkaererg itidislwkf ettkyyitii dapghrdfik nmitgtsqad cavlivaagv  
121 gefeagiskn gqtrehalla ytlgvkqliv gvnkmdstep aysekrydei vkevsayikk  
181 igynpatvpf vpsigwhgdn mlepsnmpw fkgwkverke gnasgvsle aldtlpptr  
241 ptdkplrpl qdvykiggig tvpvgrvetg ilrpgmvvtf apvnittevk svemhheals  
301 ealpgdngvf nvknsvkdi rrgnvcgdsd adppqaaaqf tsqviilnhp gqisagyspv  
361 idchtahiac kfaelkekid rrsykkledn pkslksgdaa ivemvpgkpm cvesfsqypp  
421 lgrfavrdmr qtvavgvikn vekksggagk vtksaqkaqk agk
```

Figura 10 - Sequenza aminoacidica della proteina eF1A2 ottenuta dalla banca dati SwissProt.

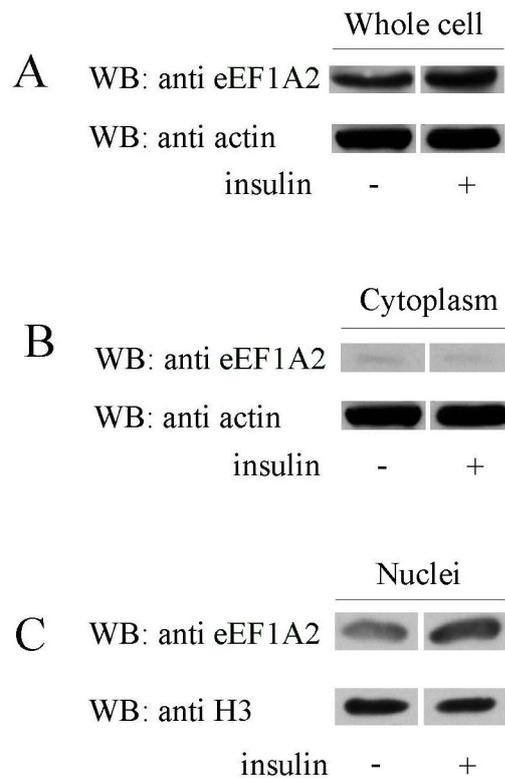
E' evidenziata la breve sequenza aminoacidica che corrisponde al motivo riconosciuto dalla famiglia delle cPKC.

## 4.2 Immunoblotting: distribuzione intracellulare di eEF1A2

Lo studio è proseguito focalizzando l'attenzione sull'eEF1A2 non solo in quanto presenta il sito di riconoscimento per cPKC ad alta stringenza, ma anche perché, a tutt'oggi, non ci sono riferimenti in letteratura che lo indichino come substrato di cPKC.

Per prima cosa ne è stata studiata la localizzazione intracellulare mediante immunoblotting su frazionamenti cellulari con anticorpo in grado di discriminare l'isoforma 2 dell'eEF1A. Sono stati preparati omogenati totali, nuclei e citoplasmi con protocolli descritti in materiali e metodi, di cellule C2C12 GM, all'80% di confluenza e cellule DM, stimolate 1 ora con insulina.

I lisati sono stati separati in SDS-PAGE al 10% e le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa. L'analisi in immunoblotting con anticorpo monoclonale anti-eEF1A2 mostra la presenza di eEF1A2 negli omogenati totali e un aumento di espressione in seguito a stimolazione con insulina (Fig. 12A). La proteina è assente a livello citoplasmatico, come mostrato nel pannello B (Fig. 12), mentre si localizza a livello nucleare e mostra un consistente aumento di espressione a seguito di stimolazione con insulina (Fig. 12C).

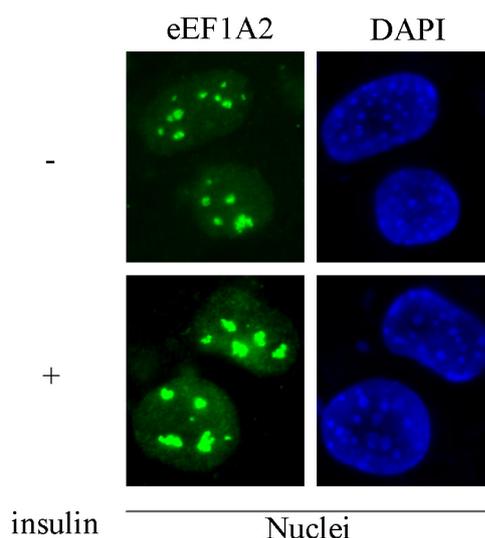


**Figura 11 - Immunoblotting sulla distribuzione intracellulare della proteina eEF1A2.**

Immunoblotting di omogenati totali (A) citoplasmi (B) e lisati nucleari (C) di C2C12 GM e DM (1 ora di stimolazione con insulina). 50µg di proteina sono stati risolti in un gel di poliacrilammide al 10%. Le proteine trasferite su membrana di nitrocellulosa sono state incubate per 16h a 4°C con anticorpo anti-eEF1A2 (1:500) e la reazione è stata sviluppata in chemiluminescenza.

### **4.3 Analisi della distribuzione di eEF1A2 con indagine immunocitochimica e trasfezione con GFP.**

Per confermare i dati di frazionamento cellulare e immunoblotting che indicano una specifica localizzazione nucleare della proteina eEF1A2 è stata effettuata un'indagine immunocitochimica con anticorpo monoclonale anti-eEF1A2 su cellule coltivate su vetrino copri-oggetto in piastre da 6 pozzetti. Le cellule GM all'80% di confluenza e le cellule DM (stimolate 1 ora con insulina) sono state fissate e preparate per la reazione immunocitochimica come descritto in materiali e metodi.

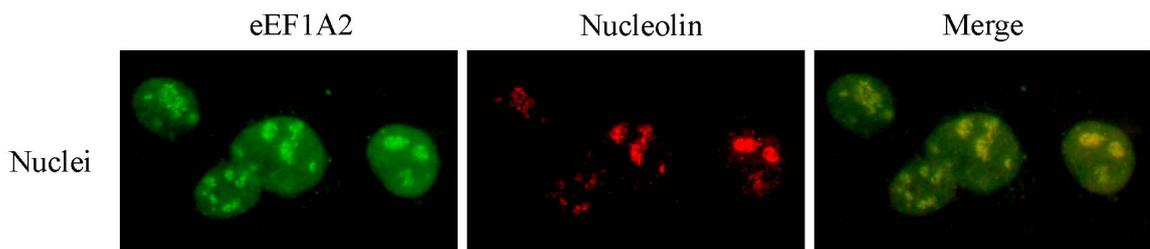


**Figura 12 - Immunocitochimica con anticorpo anti-eEF1A2 su cellule C2C12.**

Cellule C2C12 coltivate su vetrino copri-oggetto sono state incubate per 16 ore con anti-eEF1A2 (1:50). La rivelazione è stata fatta utilizzando un anticorpo secondario anti-*mouse* FITC-coniugato (1:500).

Le immagini di immunocitochimica in Figura 13 mostrano non soltanto una presenza esclusivamente nucleare di eEF1A2 nelle cellule C2C12, ma in particolare si evidenzia una localizzazione prevalentemente nucleolare. Inoltre, l'espressione di eEF1A2 a livello nucleolare aumenta considerevolmente in seguito a stimolo con insulina.

Per confermare la specifica localizzazione della proteina a livello nucleolare è stata effettuata una doppia reazione immunocitochimica utilizzando l'anticorpo anti-eEF1A2 e l'anticorpo diretto contro la nucleolina, una proteina considerata uno specifico marcatore nucleolare. Le cellule C2C12 sono state coltivate su vetrino copri-oggetto in piastre da 6 pozzetti. E' stato quindi applicato un protocollo di estrazione di nuclei "*in situ*", descritto in materiali e metodi, per facilitare il procedimento di doppia reazione antigene-anticorpo. La Figura 14 mostra una perfetta sovrapposizione dei segnali provenienti dalla co-localizzazione di eEF1A2 e della nucleolina, evidenziando una localizzazione prevalentemente nucleolare della isoforma 2 del fattore di elongazione. Un'ulteriore conferma della localizzazione nucleolare di eEF1A2 è stata messa in evidenza mediante la trasfezione delle cellule con un costrutto GFP (*green fluorescent protein*) in cui è stata clonata la sequenza nucleotidica del fattore di elongazione. Le cellule coltivate su vetrino copri-oggetto e al 50% di confluenza sono state trasfettate con il vettore GFP-eEF1A2 che

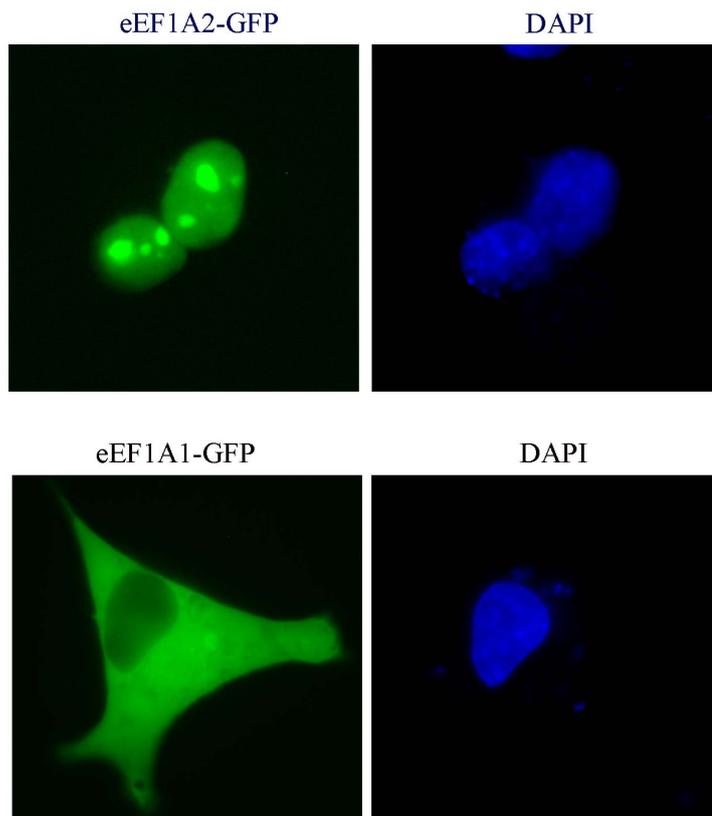


**Figura 13 - Immunocitochimica con anticorpo anti-eEF1A2 e anti-nucleolina su nuclei “*in situ*”.**

Nuclei “*in situ*” di C2C12 coltivate su vetrino copri-oggetto sono stati incubati per 16 ore con anti-eEF1A2 (1:50) e 1 ora con l’anticorpo secondario anti-*mouse* FITC-coniugato (1:500). Per la seconda incubazione è stato utilizzato l’anticorpo anti-nucleolina/C23 (1:50) per 2 ore, quindi l’anticorpo secondario anti-*mouse* TRITC-coniugato (1:500).

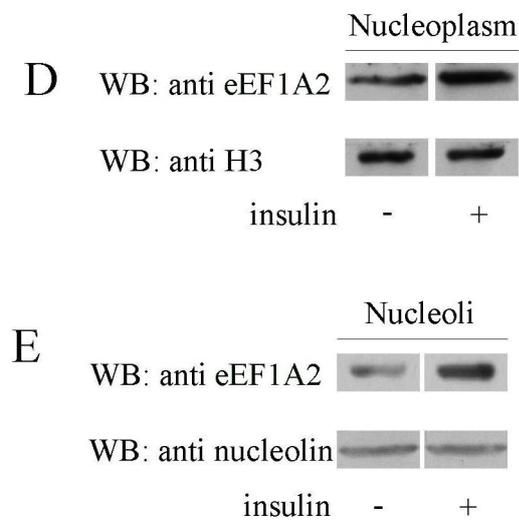
esprime la proteina chimerica costituita dalla *green fluorescent protein* e dalla proteina eEF1A2. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza. Come è possibile osservare in Figura 15, la localizzazione della proteina ricombinante è esattamente sovrapponibile alle immagini ottenute con la reazione immunocitochimica con anticorpo specifico. Mentre la trasfezione con il costrutto che esprime solo GFP mostra una localizzazione prevalentemente citoplasmatica della proteina fluorescente, la trasfezione con il vettore esprimente la proteina chimerica ricombinante mostra una localizzazione esclusivamente nucleare e una marcata distribuzione nei nucleoli.

I risultati ottenuti in immunocitochimica e con l’utilizzo della proteina ricombinante GFP hanno confermato una localizzazione esclusivamente nucleare di eEF1A2 nelle cellule C2C12 ma hanno anche mostrato una prevalente localizzazione nucleolare del fattore di elongazione. È stato quindi anche preparato un frazionamento cellulare per ottenere nuclei e nucleoli dalle cellule C2C12 GM e DM come illustrato in materiali e metodi. Successivamente, i lisati ottenuti sono stati analizzati in immunoblotting con anticorpo anti-eEF1A2 e i dati ottenuti hanno confermato la presenza di eEF1A2 nel nucleolo ed un aumento consistente della sua espressione dopo stimolo con insulina (Fig. 16).



**Figura 14 - Distribuzione intracellulare di eEF1A2 mediante l'utilizzo del vettore GFP-eEF1A2.**

Cellule C2C12 coltivate su vetrino copri-oggetto al 50% di confluenza sono state trasfettate con il costrutto GFP-eEF1A2 (pannello A) o con il vettore GFP (pannello B). Dopo 24 ore, le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza.



**Figura 15 - Immunoblotting di eEF1A2 in estratti cellulari nucleari e nucleolari.**

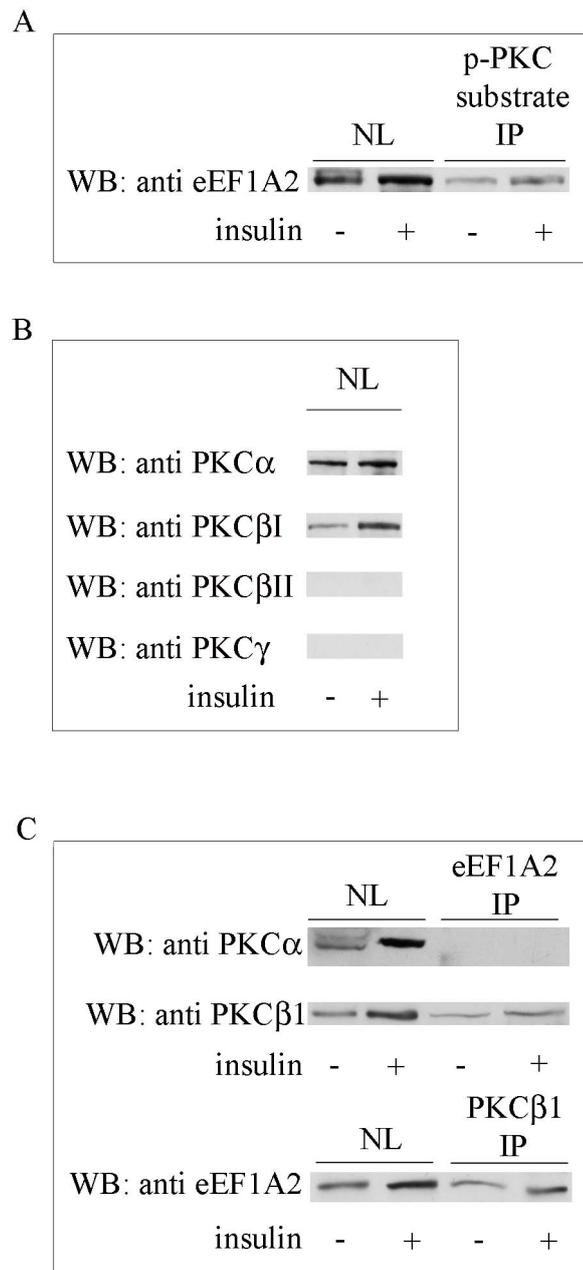
50 µg di lisati nucleari e 10 µg di lisati nucleolari sono stati separati in SDS-PAGE 10%. L'immunoblotting è stato eseguito con anticorpo anti-eEF1A2 1:500 per 16h a 4°C e rivelato in chemiluminescenza.

#### **4.4 Analisi in immunoblotting della distribuzione delle isoforme di cPKC in nuclei di cellule C2C12.**

Per confermare i dati che evidenziano il fattore di elongazione eEF1A2 come un nuovo substrato fosforilato da almeno un'isoforma delle PKC convenzionali, è stato ripetuto l'esperimento di immunoprecipitazione con anticorpo anti-*phospho cPKC substrate* e verificato la presenza di eEF1A2 con l'anticorpo specifico. In Figura 17 è mostrato l'immunoblotting corrispondente all'immunoprecipitazione descritta: nelle prime due corsie sono stati separati rispettivamente 50  $\mu$ g di lisato nucleare di C2C12 GM e 50  $\mu$ g di lisato nucleare di C2C12 DM (stimolate 1 ora con insulina); la terza e la quarta corsia corrispondono alla separazione dell'immunoprecipitato con anti-*phospho cPKC substrate* (1mg di lisato nucleare di C2C12 GM e DM). Le proteine trasferite su membrana di nitrocellulosa sono state rivelate con anticorpo anti-eEF1A2. Come mostrato nel pannello A della Figura 17, si evidenzia un aumento di espressione di eEF1A2 nei nuclei di C2C12 in seguito a stimolo con insulina e che non solo l'anticorpo anti-*phospho cPKC substrate* è in grado di legare eEF1A2 ma anche che, nei nuclei di C2C12, il legame aumenta in seguito a trattamento con insulina. Questi dati indicano che l'aumento dell'espressione del fattore di elongazione nei nuclei di C2C12 è accompagnato anche dall'aumento della fosforilazione del residuo di serina all'interno del motivo riconosciuto dall'anticorpo anti-*phospho cPKC substrate*.

Il passo successivo è stato quello di verificare quali isoforme di cPKC siano presenti nei nuclei di C2C12 per poi successivamente identificare quale isoforma sia responsabile della fosforilazione di eEF1A2. È stato eseguito un immunoblotting di lisati nucleari di C2C12 GM e DM (stimolate 1 ora con insulina) utilizzando un pannello di anticorpi specifici che riconoscono le diverse isoforme di cPKC. Come mostrato in Figura 18B, le isoforme PKC $\beta$ II e PKC $\gamma$  non sono espresse nei nuclei di C2C12, anche in seguito a stimolo con insulina. Sono espresse invece la PKC $\alpha$  e la PKC $\beta$ I, con una maggiore espressione dell'isoforma  $\alpha$  rispetto all'isoforma  $\beta$ 1 in nuclei di cellule GM. Inoltre, l'immunoblotting mostra un aumento di espressione di entrambe le isoforme nei nuclei di cellule DM rispetto ai nuclei GM.

Alla luce dei dati ottenuti, l'attenzione è stata diretta all'identificazione dell'isoforma di PKC, tra l'isoforma  $\alpha$  e l'isoforma  $\beta$ I, responsabile della fosforilazione del fattore di



**Figura 16 - Immunoblotting delle isoforme di cPKC in nuclei di cellule C2C12 e analisi dell'interazione di eEF1A2 con l'isoforma PKC- $\beta$ 1.**

(A) 1 mg di lisato nucleare di C2C12 GM e DM è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-*phospho cPKC substrate* e verificato la presenza di eEF1A2 con l'anticorpo specifico (B) 50  $\mu$ g di lisato nucleare di C2C12 GM e DM sono stati separati in SDS-PAGE 10%. L'immunoblotting è stato eseguito con anticorpi diretti contro le differenti isoforme di cPKC (1:50) per 16h a 4°C e rivelato in chemiluminescenza. (C) 1 mg di lisato nucleare di C2C12 GM e DM è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-eEF1A2 e anti-PKC $\beta$ 1 per identificare l'isoforma di cPKC responsabile della fosforilazione del fattore di elongazione.

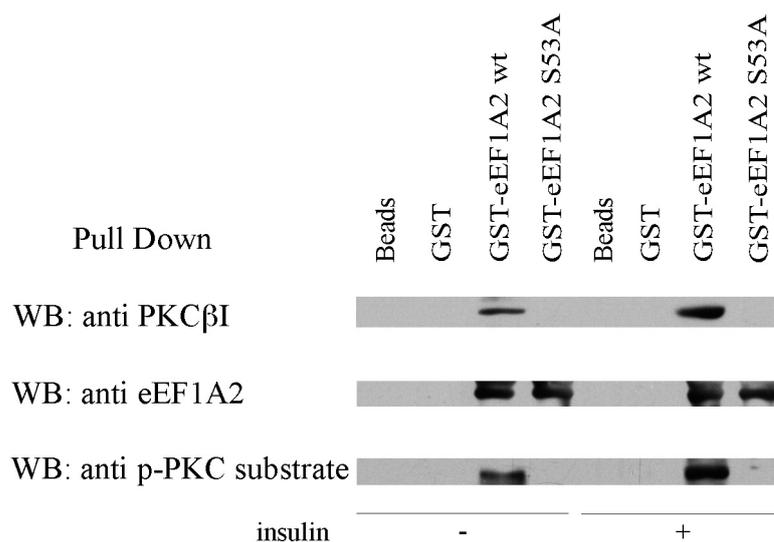
elongazione eEF1A2 a livello nucleare. Il nostro approccio si è basato sulla considerazione che nel processo di fosforilazione “*in vivo*” è necessaria un’interazione diretta tra la chinasi e il suo substrato e quindi abbiamo verificato la nostra ipotesi con esperimenti di immunoprecipitazione.

Nel primo esperimento, eEF1A2 è stato immunoprecipitato in lisati nucleari di C2C12 GM e DM e rivelato, rispettivamente, sia con anticorpo anti-PKC $\alpha$  che anti-PKC $\beta$ 1. Come mostrato nel pannello C della figura 17, solo l’isoforma  $\beta$ 1 della PKC è in grado di legare eEF1A2 nei nuclei di C2C12 e questo legame è già presente in cellule GM.

Per confermare ulteriormente il legame tra la PKC $\beta$ 1 ed eEF1A2, lisati nucleari di C2C12 GM e DM sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-PKC $\beta$ 1 e l’immunoblotting è stato rivelato con anticorpo anti-eEF1A2, confermando l’esistenza di un legame diretto “*in vivo*” tra la chinasi e il suo substrato e che questo legame aumenta nei nuclei di cellule C2C12 trattate con insulina, così come l’espressione sia di eEF1A2 che di PKC $\beta$ 1. Questi dati costituiscono una prova indiretta del coinvolgimento della PKC $\beta$ 1 nel processo fosforilativo della proteina eEF1A2.

## **4.5 Esperimenti di “*pull-down*” con le proteine ricombinanti GST-eEF1A2 e eEF1A2/S53A**

Dopo aver individuato l’isoforma di cPKC coinvolta nel processo di fosforilazione del fattore di elongazione eEF1A2 e dopo aver dimostrato un legame diretto “*in vivo*” tra la chinasi e il suo substrato, è stato verificato se il legame fosse effettivamente dipendente dalla presenza del residuo di serina in posizione 53 nella sequenza aminoacidica di eEF1A2. Sono stati eseguiti esperimenti di “*pull-down*” su lisati nucleari di C2C12 utilizzando due proteine ricombinanti, come descritto in materiali e metodi. La prima proteina ricombinante è una chimera formata dalla glutatione-S-transferasi e dalla forma “*wild-type*” di eEF1A2, mentre la seconda è una chimera formata dalla glutatione S-transferasi e dalla forma mutata di eEF1A2 che presenta un residuo di alanina al posto della serina in posizione 53 della sequenza aminoacidica.



**Figura 17 - Pull-down con proteine ricombinanti GST-eEF1A2 e GST-eEF1A2/S53A**

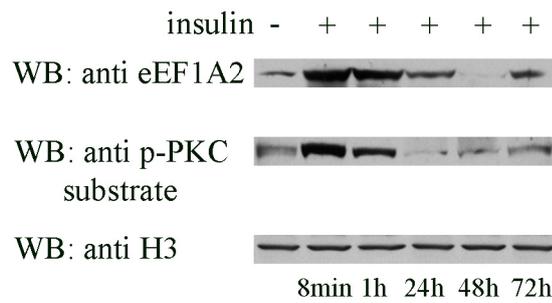
1mg di lisato nucleare è stato incubato con 40  $\mu$ l di una soluzione di *glutathione-sepharose* legato alla proteina ricombinante GST-eEF1A2 o alla proteina ricombinante GST-eEF1A2/S53A. Al pellet sono stati aggiunti 30  $\mu$ l di *Laemmli buffer* e il surnatante è stato separato in SDS-PAGE 10%. L'immunoblotting è stato eseguito incubando con anti-PKC $\beta$ I 1:500, anti-eEF1A2 1:500, anti- anti-*phospho cPKC substrate* per 16h a 4°C e sviluppato in chemiluminescenza.

Il “*pull-down*” è stato preparato su lisati nucleari di cellule GM e DM (stimolate 1 ora con insulina), risolto in SDS-PAGE e trasferito su nitrocellulosa. Il blot è stato rivelato con anticorpo anti-PKC $\beta$ 1, anti-eEF1A2 e anti- anti-*phospho cPKC substrate*.

La figura 18 mostra che il legame tra la PKC $\beta$ 1 ed eEF1A2 avviene solo in presenza del residuo di serina 53 ed inoltre che la fosforilazione della serina da parte di PKC $\beta$ 1 avviene anche sul substrato endogeno ed è condizione necessaria per il legame con la chinasi.

## 4.6 Espressione del fattore di elongazione eEF1A2 durante il processo di differenziamento miogenico

Il fattore di elongazione eEF1A2 è stato identificato come nuovo substrato di PKC $\beta$ I nel differenziamento miogenico indotto da insulina, a tempi brevi di stimolazione. Il lavoro sperimentale è proseguito verificando l'andamento dell'espressione e della fosforilazione



**Figura 18 - Immunoblotting di eEF1A2 in lisati nucleari di C2C12.**

50 µg di lisato nucleare di C2C12 GM e C2C12 DM a diversi tempi di stimolazione con insulina, sono stati separati in SDS-PAGE 10%. L'immunoblotting è stato eseguito incubando con anti-eEF1A2 1:500 per 16h a 4°C e rivelato in chemiluminescenza. La membrana è stata quindi trattata per eliminare l'anticorpo utilizzato nella prima incubazione e reincubata con anticorpo anti-*phospho cPKC substrate* 1:500 per 16h a 4°C e rivelata in chemiluminescenza.

di eEF1A2 durante il differenziamento anche utilizzando stimoli più prolungati con insulina, compatibili con un differenziamento miogenico terminale. L'immunoblotting con anticorpo anti-eEF1A2 su lisati nucleari a diversi tempi di stimolazione con insulina (Fig. 19) mostra un'elevata espressione di eEF1A2 già dopo 8 minuti di stimolazione, espressione che cala leggermente ma si mantiene comunque elevata dopo 1 ora e che ritorna quasi ai livelli del controllo dopo 24 ore di stimolazione. La presenza della proteina non è più evidenziabile dopo 48 ore ma torna ad essere elevata dopo 72 ore di stimolo, mettendo in evidenza che l'espressione di eEF1A2 a livello nucleare è fondamentale sia nelle prime fasi di stimolo differenziativo sia nel differenziamento terminale. Anche il livello di fosforilazione della Ser<sup>53</sup>, determinato con l'utilizzo dell'anticorpo anti-*phospho cPKC substrate*, mostra il medesimo andamento suggerendo che l'attività della PKCβI sul fattore di elongazione sia fondamentale nelle prime fasi di induzione al differenziamento ma anche nel completamento del programma differenziativo.

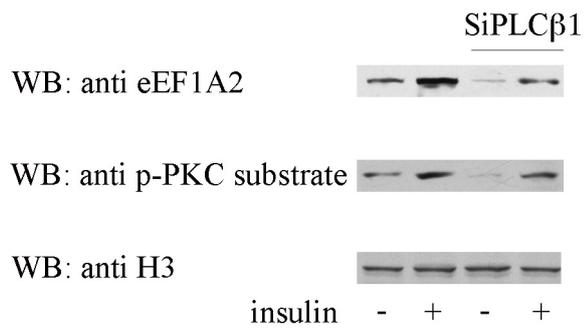
## 4.7 Effetto del silenziamento della PI-PLC $\beta$ 1 sull'espressione e fosforilazione del fattore di elongazione eEF1A2

I dati fino ad ora ottenuti hanno mostrato che eEF1A2 è un nuovo substrato dell'attività di PKC $\beta$ 1 a livello nucleare in risposta allo stimolo con insulina. Il livello elevato di fosforilazione di eEF1A2 che compare già a 8 min di stimolo, resta elevato a 1 ora di trattamento e si mantiene a livelli superiori al controllo nel corso differenziamento miocitico terminale. E' noto inoltre che l'aumento di espressione della PLC $\beta$ 1 nei nuclei di C2C12 stimolati con insulina è rilevabile già nelle prime ore di trattamento. Si è quindi pensato di silenziare l'espressione della PLC $\beta$ 1 per valutare se l'attività della PKC $\beta$ 1 è conseguente ad una attivazione nucleare della PLC $\beta$ 1 agli stessi tempi di trattamento in cui eEF1A2 è stato identificato come substrato specifico dell'attività di PKC $\beta$ 1.

Le cellule C2C12 sono state trasfettate con breve sequenze oligonucleotidiche disegnate appositamente per silenziare l'espressione della PLC $\beta$ 1. Dopo 24 ore le cellule sono state stimolate con insulina per 1 ora e quindi sono stati preparati omogenati totali delle cellule GM e delle cellule DM.

E' stato fatto un immunoblotting per verificare l'espressione di eEF1A2 e la stessa membrana, dopo aver rimosso l'anticorpo della prima incubazione, è stata reincubata con anticorpo anti-*phospho cPKC substrate* (fig. 20).

Il risultato è che, nelle cellule stimolate con insulina, il silenziamento della PLC $\beta$ 1 si traduce in una drastica riduzione dell'espressione di eEF1A2 rispetto al campione non silenziato ed una minore fosforilazione come si può rilevare dall'utilizzo dell'anticorpo anti-*phospho cPKC substrate*. Questo risultato permette quindi di sostenere che l'attivazione di PKC $\beta$ 1 nei nuclei di C2C12 stimolate a tempi brevi con insulina sia strettamente dipendente dalla precoce attivazione della PLC $\beta$ 1.



**Figura 19 - Immunoblotting di eEF1A2 in omogenati totali di C2C12.**

50 µg di omogenato totale di C2C12 GM e DM (1 ora di stimolo con insulina) e di omogenato totale di C2C12 GM e DM dopo 24 ore di trasfezione con gli oligonucleotidi per silenziare l'espressione della PLCβ1, sono stati separati in SDS-PAGE 10%. L'immunoblotting è stato eseguito incubando con anti-eEF1A2 1:500 per 16h a 4°C e rivelato in chemiluminescenza. La membrana è stata quindi trattata per eliminare l'anticorpo utilizzato nella prima incubazione e reincubata con anticorpo anti-*phospho cPKC substrate* 1:500 per 16h a 4°C e rivelata in chemiluminescenza.

## Capitolo 5 Conclusioni

Dati recenti hanno suggerito un ruolo fondamentale della trasduzione del segnale lipidico nucleare nel regolare processi cellulari quali differenziamento e proliferazione. In diversi sistemi cellulari è ormai noto che le isoforme di PLC, ma in particolare la PI-PLC  $\beta 1$ , hanno un ruolo fondamentale a livello nucleare nel modulare le risposte della cellula a stimoli differenziativi e proliferativi. Soprattutto nello studio del differenziamento eritroide e muscolare è emerso che l'attivazione dell'isoforma  $\beta 1$  della PLC presente nel nucleo è fondamentale per dare inizio e condurre la cascata di eventi a livello molecolare che consentono un corretto completamento del programma differenziativo. Com'è noto, l'attività idrolitica che la PI-PLC  $\beta 1$  esercita, nel nucleo, sul PIP<sub>2</sub> genera i due secondi messaggeri IP<sub>3</sub> e DAG. Il DAG è l'attivatore fisiologico di diverse isoforme di PKC, che a loro volta sono in grado di fosforilare i residui di serina e treonina di molteplici substrati. Sono numerose le proteine identificate come bersaglio dell'attività delle diverse isoforme di PKC sia a livello citoplasmatico sia a livello nucleare, in risposta a stimoli differenziativi e proliferativi che agiscono su recettori della membrana citoplasmatica. Quello che ancora non è solo parzialmente noto, sono i bersagli molecolari delle PKC a livello nucleare, in seguito ad attivazione specifica della PI-PLC  $\beta 1$  nel nucleo. I recenti sviluppi e progressi del campo della proteomica ha aperto nuove strade e nuovi sviluppi nello studio delle proteine ed in particolare delle fosfoproteine. L'approccio proteomico è una visione olistica della biologia cellulare, che consente di ricavare contemporaneamente informazioni su centinaia di proteine e seguirne il destino dal punto di vista funzionale. Soprattutto nello studio delle fosfoproteine e dei processi fosforilativi si sono sviluppate tecniche separative di proteomica funzionale e di analisi in spettrometria di massa che consentono di studiare in modo approfondito uno dei meccanismi fondamentali della regolazione post-traduzionale. L'utilizzo di anticorpi che riconoscono specifici motivi fosforilati unito alle sofisticate tecniche di analisi in spettrometria di massa, costituiscono un valido supporto nell'identificazione di nuove proteine effettrici delle risposte cellulari in processi differenziativi, proliferativi ed apoptotici.

In questo lavoro si è cercato di combinare un approccio di proteomica funzionale allo studio di una specifica via di traduzione del segnale lipidico, alla ricerca dei target molecolari nella via di attivazione delle chinasi della famiglia delle PKC convenzionali. Tra le proteine identificate, che sono fosforilate dalle isoforme della PKC convenzionali in seguito a stimolo differenziativo in mioblasti in coltura, è emersa una nuova proteina, l'isoforma 2 del fattore di elongazione eEF1A. eEF1A è una proteina ubiquitaria altamente espressa all'interno della cellula e che presenta un alto grado di conservazione durante l'evoluzione.

Negli eucarioti superiori sono stati identificati due geni distinti che codificano per due distinte isoforme, eEF1A1 ed eEF1A2: queste due isoforme presentano un'omologia superiore al 90% sia a livello nucleotidico che aminoacidico e svolgono essenzialmente la stessa funzione durante la sintesi proteica. Questa proteina è stata descritta ampiamente in molti sistemi cellulari ed è noto un suo coinvolgimento in stimoli proliferativi e differenziativi. In particolare, per quanto riguarda l'isoforma 2 del fattore di elongazione, ci sono studi importanti che mettono in evidenza una sua overespressione in un'elevata percentuale di tumori dell'ovaio, della mammella e del polmone.

Il nostro studio ha evidenziato la presenza dell'isoforma 2 della proteina eEF1A nel nucleo di mioblasti in coltura, ed in particolare nei nucleoli, ed ha identificato questo fattore come nuovo substrato di PKC $\beta$ 1 in seguito a stimolo differenziativo miogenico nella via di trasduzione del segnale che vede una precoce attivazione della PI-PLC  $\beta$ 1 nucleare. Sviluppi futuri di questo studio prevedono il tentativo di chiarire, a livello molecolare, il ruolo effettivo di eEF1A2 nel complesso processo di formazione della fibra muscolare matura avvalendosi delle tecniche di proteomica funzionale e di biologia cellulare più all'avanguardia.

## Bibliografia

1. Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, Bareggi R, Manzoli L, Narducci P, et al. Diacylglycerol kinases in nuclear lipid-dependent signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jul;59(7):1129-37.
2. Malviya AN, Rogue PJ. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell.* 1998 Jan 9;92(1):17-23.
3. Bootman MD, Thomas D, Tovey SC, Berridge MJ, Lipp P. Nuclear calcium signalling. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Mar;57(3):371-8.
4. York JD, Odom AR, Murphy R, Ives EB, Wentz SR. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science.* 1999 Jul 2;285(5424):96-100.
5. Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, Wentz SR, O'Shea EK. Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science.* 2003 Jan 3;299(5603):114-6.
6. Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Manzoli L, Evangelisti C, Fala F, et al. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell Signal.* 2006 Aug;18(8):1101-7.
7. Boronenkov IV, Loijens JC, Umeda M, Anderson RA. Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell.* 1998 Dec;9(12):3547-60.
8. Ciruela A, Hinchliffe KA, Divecha N, Irvine RF. Nuclear targeting of the beta isoform of type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its alpha-helix 7. *Biochem J.* 2000 Mar 15;346 Pt 3:587-91.
9. Manzoli FA, Capitani S, Mazzotti G, Barnabei O, Maraldi NM. Role of chromatin phospholipids on template availability and ultrastructure of isolated nuclei. *Adv Enzyme Regul.* 1982;20:247-62.
10. Ridsdale JA, Hendzel MJ, Delcuve GP, Davie JR. Histone acetylation alters the capacity of the H1 histones to condense transcriptionally active/competent chromatin. *J Biol Chem.* 1990 Mar 25;265(9):5150-6.
11. van Holde K, Zlatanova J. What determines the folding of the chromatin fiber? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1;93(20):10548-55.

12. Cheng MK, Shearn A. The direct interaction between ASH2, a *Drosophila* trithorax group protein, and SKTL, a nuclear phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, implies a role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in maintaining transcriptionally active chromatin. *Genetics*. 2004 Jul;167(3):1213-23.
13. Eisen JA, Sweder KS, Hanawalt PC. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*. 1995 Jul 25;23(14):2715-23.
14. Shen X, Ranallo R, Choi E, Wu C. Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell*. 2003 Jul;12(1):147-55.
15. Rando OJ, Zhao K, Janmey P, Crabtree GR. Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):2824-9.
16. Divecha N, Roefs M, Los A, Halstead J, Bannister A, D'Santos C. Type I PIPkinases interact with and are regulated by the retinoblastoma susceptibility gene product-pRB. *Curr Biol*. 2002 Apr 2;12(7):582-7.
17. Jones DR, Divecha N. Linking lipids to chromatin. *Curr Opin Genet Dev*. 2004 Apr;14(2):196-202.
18. Drin G, Scarlata S. Stimulation of phospholipase C $\beta$  by membrane interactions, interdomain movement, and G protein binding--how many ways can you activate an enzyme? *Cell Signal*. 2007 Jul;19(7):1383-92.
19. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:281-312.
20. Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLC $\zeta$  (zeta): a sperm protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol*. 2006 Apr;17(2):264-73.
21. Rhee SG, Bae YS. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem*. 1997 Jun 13;272(24):15045-8.
22. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*. 1989 May 5;244(4904):546-50.
23. Rameh LE, Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):8347-50.
24. Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*. 1994 Sep 8;371(6493):168-70.

25. Essen LO, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature*. 1996 Apr 18;380(6575):595-602.
26. Lopez I, Mak EC, Ding J, Hamm HE, Lomasney JW. A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2758-65.
27. Cocco L, Capitani S, Maraldi NM, Mazzotti G, Barnabei O, Gilmour RS, et al. Inositol lipid cycle and autonomous nuclear signalling. *Adv Enzyme Regul*. 1996;36:101-14.
28. Bertagnolo V, Marchisio M, Volinia S, Caramelli E, Capitani S. Nuclear association of tyrosine-phosphorylated Vav to phospholipase C-gamma1 and phosphoinositide 3-kinase during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett*. 1998 Dec 28;441(3):480-4.
29. Bertagnolo V, Grassilli S, Bavelloni A, Brugnoli F, Piazzini M, Candiano G, et al. Vav1 modulates protein expression during ATRA-induced maturation of APL-derived promyelocytes: a proteomic-based analysis. *J Proteome Res*. 2008 Sep;7(9):3729-36.
30. Liu N, Fukami K, Yu H, Takenawa T. A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J Biol Chem*. 1996 Jan 5;271(1):355-60.
31. Yamaga M, Fujii M, Kamata H, Hirata H, Yagisawa H. Phospholipase C-delta1 contains a functional nuclear export signal sequence. *J Biol Chem*. 1999 Oct 1;274(40):28537-41.
32. Bahk YY, Lee YH, Lee TG, Seo J, Ryu SH, Suh PG. Two forms of phospholipase C-beta 1 generated by alternative splicing. *J Biol Chem*. 1994 Mar 18;269(11):8240-5.
33. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L, Cocco L. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature*. 1992 Jul 16;358(6383):242-5.
34. Divecha N, Letcher AJ, Banfic HH, Rhee SG, Irvine RF. Changes in the components of a nuclear inositide cycle during differentiation in murine erythroleukaemia cells. *Biochem J*. 1995 Nov 15;312 ( Pt 1):63-7.
35. Davis L, Cadrin M, Brown DL, Chaly N. Reversible disassembly of transcription domains in lymphocyte nuclei during inhibition of RNA synthesis by DRB. *Biol Cell*. 1993;78(3):163-80.

36. Spector DL, Schrier WH, Busch H. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol Cell*. 1983;49(1):1-10.
37. Huang S, Deerinck TJ, Ellisman MH, Spector DL. The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell nucleus. *J Cell Biol*. 1997 Jun 2;137(5):965-74.
38. Pombo A, Cook PR. The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. *Exp Cell Res*. 1996 Dec 15;229(2):201-3.
39. Lallena MJ, Martinez C, Valcarcel J, Correas I. Functional association of nuclear protein 4.1 with pre-mRNA splicing factors. *J Cell Sci*. 1998 Jul 30;111 ( Pt 14):1963-71.
40. Martelli AM, Bareggi R, Cocco L, Manzoli FA. Stimulation of nuclear polyphosphoinositide synthesis by GTP-gamma-S: a potential regulatory role for nuclear GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 5;218(1):182-6.
41. Martelli AM, Cocco L, Bareggi R, Tabellini G, Rizzoli R, Ghibellini MD, et al. Insulin-like growth factor-I-dependent stimulation of nuclear phospholipase C-beta1 activity in Swiss 3T3 cells requires an intact cytoskeleton and is paralleled by increased phosphorylation of the phospholipase. *J Cell Biochem*. 1999 Mar 1;72(3):339-48.
42. Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, et al. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol*. 2001 May;21(9):2981-90.
43. Ryu SH, Kim UH, Wahl MI, Brown AB, Carpenter G, Huang KP, et al. Feedback regulation of phospholipase C-beta by protein kinase C. *J Biol Chem*. 1990 Oct 15;265(29):17941-5.
44. Litosch I. G-protein betagamma subunits antagonize protein kinase C-dependent phosphorylation and inhibition of phospholipase C-beta1. *Biochem J*. 1997 Sep 15;326 ( Pt 3):701-7.
45. Yamamura Y, Senda H, Kageyama Y, Matsuzaki T, Noda M, Ikawa Y. Erythropoietin and Friend virus gp55 activate different JAK/STAT pathways through the erythropoietin receptor in erythroid cells. *Mol Cell Biol*. 1998 Mar;18(3):1172-80.
46. Cocco L, Gilmour RS, Maraldi NM, Martelli AM, Papa S, Manzoli FA. Increase of globin RNA synthesis induced by phosphatidylserine liposomes in isolated erythroleukemic cell nuclei. Morphological and functional features. *Biol Cell*. 1985;54(1):49-56.

47. Martelli AM, Billi AM, Gilmour RS, Neri LM, Manzoli L, Ognibene A, et al. Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend cells: phospholipase C beta down-regulation is related to cell differentiation. *Cancer Res.* 1994 May 15;54(10):2536-40.
48. Faenza I, Matteucci A, Bavelloni A, Marmioli S, Martelli AM, Gilmour RS, et al. Nuclear PLCbeta(1) acts as a negative regulator of p45/NF-E2 expression levels in Friend erythroleukemia cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002 May 8;1589(3):305-10.
49. Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, et al. A role for nuclear phospholipase Cbeta 1 in cell cycle control. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30520-4.
50. Fiume R, Faenza I, Matteucci A, Astolfi A, Vitale M, Martelli AM, et al. Nuclear phospholipase C beta1 (PLCbeta1) affects CD24 expression in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* 2005 Jun 24;280(25):24221-6.
51. Bavelloni A, Faenza I, Cioffi G, Piazzini M, Parisi D, Matic I, et al. Proteomic-based analysis of nuclear signaling: PLCbeta1 affects the expression of the splicing factor SRp20 in Friend erythroleukemia cells. *Proteomics.* 2006 Nov;6(21):5725-34.
52. Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 1977;7(3):159-66.
53. Florini JR, Ewton DZ, Magri KA. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:201-16.
54. Faenza I, Ramazzotti G, Bavelloni A, Fiume R, Gaboardi GC, Follo MY, et al. Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter. *Endocrinology.* 2007 Mar;148(3):1108-17.
55. Faenza I, Bavelloni A, Fiume R, Santi P, Martelli AM, Maria Billi A, et al. Expression of phospholipase C beta family isoenzymes in C2C12 myoblasts during terminal differentiation. *J Cell Physiol.* 2004 Aug;200(2):291-6.
56. Matteucci A, Faenza I, Gilmour RS, Manzoli L, Billi AM, Peruzzi D, et al. Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C beta 1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5057-60.
57. Faenza I, Bavelloni A, Fiume R, Lattanzi G, Maraldi NM, Gilmour RS, et al. Up-regulation of nuclear PLCbeta1 in myogenic differentiation. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):446-52.

58. Cenciarelli C, De Santa F, Puri PL, Mattei E, Ricci L, Bucci F, et al. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol*. 1999 Jul;19(7):5203-17.
59. Wang Z, Sicinski P, Weinberg RA, Zhang Y, Ravid K. Characterization of the mouse cyclin D3 gene: exon/intron organization and promoter activity. *Genomics*. 1996 Jul 1;35(1):156-63.
60. Mariappan I, Parnaik VK. Sequestration of pRb by cyclin D3 causes intranuclear reorganization of lamin A/C during muscle cell differentiation. *Mol Biol Cell*. 2005 Apr;16(4):1948-60.
61. Evangelisti C, Riccio M, Faenza I, Zini N, Hozumi Y, Goto K, et al. Subnuclear localization and differentiation-dependent increased expression of DGK-zeta in C2C12 mouse myoblasts. *J Cell Physiol*. 2006 Nov;209(2):370-8.
62. Ross EM, Mateu D, Gomes AV, Arana C, Tran T, Litosch I. Structural determinants for phosphatidic acid regulation of phospholipase C-beta1. *J Biol Chem*. 2006 Nov 3;281(44):33087-94.
63. Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, Manzoli FA. Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1761(5-6):542-51.
64. Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem*. 1997 Jan 10;272(2):952-60.
65. Songyang Z, Blechner S, Hoagland N, Hoekstra MF, Piwnicka-Worms H, Cantley LC. Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol*. 1994 Nov 1;4(11):973-82.
66. Kawakami T, Kawakami Y, Kitaura J. Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. *J Biochem*. 2002 Nov;132(5):677-82.
67. Banan A, Zhang LJ, Farhadi A, Fields JZ, Shaikh M, Keshavarzian A. PKC-beta1 isoform activation is required for EGF-induced NF-kappaB inactivation and IkappaBalpha stabilization and protection of F-actin assembly and barrier function in enterocyte monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Mar;286(3):C723-38.
68. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):761-6.

69. Chambers RL, McDermott JC. Molecular basis of skeletal muscle regeneration. *Can J Appl Physiol*. 1996 Jun;21(3):155-84.
70. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol*. 1995 Sep-Oct;73(9-10):723-32.
71. Perry RL, Rudnick MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci*. 2000 Sep 1;5:D750-67.
72. Friday BB, Mitchell PO, Kegley KM, Pavlath GK. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation*. 2003 Apr;71(3):217-27.
73. Tomczak KK, Marinescu VD, Ramoni MF, Sanoudou D, Montanaro F, Han M, et al. Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *Faseb J*. 2004 Feb;18(2):403-5.
74. Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*. 2000 Jan;57(1):16-25.
75. Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol*. 1989 Nov;9(11):5022-33.
76. Naya FJ, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Dec;11(6):683-8.
77. Blackwell TK, Weintraub H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*. 1990 Nov 23;250(4984):1104-10.
78. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Aug-Oct;16(4-5):585-95.
79. Andres V, Walsh K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol*. 1996 Feb;132(4):657-66.
80. Franklin DS, Xiong Y. Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. *Mol Biol Cell*. 1996 Oct;7(10):1587-99.
81. Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *Embo J*. 1989 Mar;8(3):701-9.

82. Edmondson DG, Olson EN. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 1989 May;3(5):628-40.
83. Molkenkin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1125-36.
84. Wasserman WW, Fickett JW. Identification of regulatory regions which confer muscle-specific gene expression. *J Mol Biol.* 1998 Apr 24;278(1):167-81.
85. Bergstrom DA, Penn BH, Strand A, Perry RL, Rudnicki MA, Tapscott SJ. Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol Cell.* 2002 Mar;9(3):587-600.
86. Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, et al. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science.* 1995 Feb 17;267(5200):1018-21.
87. Zhang P, Wong C, Liu D, Finegold M, Harper JW, Elledge SJ. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* 1999 Jan 15;13(2):213-24.
88. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):131-4.
89. Walsh K, Perlman H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 Oct;7(5):597-602.
90. Jahn L, Sadoshima J, Izumo S. Cyclins and cyclin-dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 muscle cells. *Exp Cell Res.* 1994 Jun;212(2):297-307.
91. Kiess M, Gill RM, Hamel PA. Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene.* 1995 Jan 5;10(1):159-66.
92. Proud CG. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans.* 2006 Apr;34(Pt 2):213-6.
93. Thornton S, Anand N, Purcell D, Lee J. Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *J Mol Med.* 2003 Sep;81(9):536-48.

94. Kahns S, Lund A, Kristensen P, Knudsen CR, Clark BF, Cavallius J, et al. The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein. *Nucleic Acids Res.* 1998 Apr 15;26(8):1884-90.
95. Lund A, Knudsen SM, Vissing H, Clark B, Tommerup N. Assignment of human elongation factor 1alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3. *Genomics.* 1996 Sep 1;36(2):359-61.
96. Jeganathan S, Lee JM. Binding of elongation factor eEF1A2 to phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and phosphatidylinositol 4-phosphate generation. *J Biol Chem.* 2007 Jan 5;282(1):372-80.
97. Amiri A, Noei F, Jeganathan S, Kulkarni G, Pinke DE, Lee JM. eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene.* 2007 May 10;26(21):3027-40.
98. Jeganathan S, Morrow A, Amiri A, Lee JM. Eukaryotic elongation factor 1A2 cooperates with phosphatidylinositol-4 kinase III beta to stimulate production of filopodia through increased phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate generation. *Mol Cell Biol.* 2008 Jul;28(14):4549-61.
99. Panasyuk G, Nemazanyy I, Filonenko V, Negrutskii B, El'skaya AV. A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):63-71.
100. Sun Y, Wong N, Guan Y, Salamanca CM, Cheng JC, Lee JM, et al. The eukaryotic translation elongation factor eEF1A2 induces neoplastic properties and mediates tumorigenic effects of ZNF217 in precursor cells of human ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* 2008 Oct 15;123(8):1761-9.
101. Lee JM. The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Oct 7;1:69.
102. Lamberti A, Caraglia M, Longo O, Marra M, Abbruzzese A, Arcari P. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article. *Amino Acids.* 2004 Jul;26(4):443-8.
103. Gross SR, Kinzy TG. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Sep;12(9):772-8.

104. Talapatra S, Wagner JD, Thompson CB. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002 Aug;9(8):856-61.
105. Shultz LD, Sweet HO, Davisson MT, Coman DR. 'Wasted', a new mutant of the mouse with abnormalities characteristic to ataxia telangiectasia. *Nature.* 1982 Jun 3;297(5865):402-4.
106. Padilla M, Libertin C, Krco C, Woloschak GE. Radiation sensitivity of T-lymphocytes from immunodeficient "wasted" mice. *Cell Immunol.* 1990 Oct 1;130(1):186-94.
107. Lamberti A, Longo O, Marra M, Tagliaferri P, Bismuto E, Fiengo A, et al. C-Raf antagonizes apoptosis induced by IFN-alpha in human lung cancer cells by phosphorylation and increase of the intracellular content of elongation factor 1A. *Cell Death Differ.* 2007 May;14(5):952-62.
108. Ruest LB, Marcotte R, Wang E. Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5418-25.

