

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

**Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche
Cliniche**

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche Umane e Molecolari
Settore Disciplinare BIO/16
Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane e Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore

**Studio di espressione e funzione della PLC β 1
nucleare in modelli murini ed umani di cellule
ematopoietiche mieloidi e linfoidi**

Tesi di Dottorato

Tutore:
CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

Presentata da:
DOTT.SSA FRANCESCA TAGLIAVINI

Coordinatore
CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

XXIII Ciclo

Anno Accademico 2010/2011

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

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

Ciclo XXIII

**Settore Concorsuale di afferenza: 05/H1
Settore Scientifico disciplinare: BIO/16**

**Studio di espressione e funzione della PLC β 1
nucleare in modelli murini ed umani di cellule
ematopoietiche mieloidi e linfoidi**

**Tesi di dottorato presentata da:
dott.ssa FRANCESCA TAGLIAVINI**

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Relatore:

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Esame finale anno 2012

INDICE

Introduzione	3
1. Emopoiesi	4
2. Leucemia	7
3. Signaling inositide-dipendente	11
4. Fosfolipasi C (PLC)	15
5. PI-PLC β 1	16
5.1. Struttura del gene della PI-PLC β 1	17
5.2. Struttura proteica della PI-PLC β 1	18
5.3. Regolazione dell'attività della PI-PLC β 1	19
5.4. Ruolo della PI-PLC β 1 nei Disordini Ematopoietici	21
5.5. Ruolo della PI-PLC β 1 nel differenziamento eritroide <i>in vitro</i>	21
5.6. Ruolo della PI-PLC β 1 nell' IGF-1 <i>signaling pathway</i>	23
6. Modelli cellulari indagati	24
7. Proteomica funzionale	28
8. Spettrometria di massa	30
Scopo della Ricerca	33
Materiali e Metodi	36
1. Colture cellulari <i>in vitro</i>	37
2. Reagenti e anticorpi	37
3. Clonaggio PLC β 1b	38
3.1. Digestione enzimatica	38
3.2. Ligazione del frammento PLC β 1b nel vettore retrovirale pBB	38
3.3. Trasformazione batterica per shock termico	39
4. Infezione delle linee FELC e Ba/F3 con il vettore retrovirale pBB-PLC β 1b	39
5. Estrazione di RNA e RT-PCR	40
6. PCR e amplificazione delle PLC β 1a e PLC β 1b endogene	40
7. Saggio MTT	41
8. Saggio clonogenico	41
9. Analisi Citofluorimetrica a Flusso (FACS)	42
10. Purificazione nuclei da cellule Ba/F3, FELC, CEM, Jurkat, HL60, NB4, THP1, K562	42
11. Preparazione del lisato proteico totale / nucleare	42
12. SDS-PAGE e analisi mediante <i>immunoblotting</i>	43
13. Immunoprecipitazione	43
14. Spettrometria di massa LC-MS/MS	44

Risultati	46
1. Ottenimento dei modelli sperimentali murini	47
2. Distribuzione subcellulare della PLC β 1b overespressa nei modelli murini	49
3. Distribuzione subcellulare della PLC β 1b endogena in linee leucemiche umane	50
4. CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLA LINEA BAF3-PLC β 1b	53
4.1. Proliferazione cellulare	53
4.2. Capacità trasformante	55
4.3. Risposta allo stimolo mitogenico IGF-1 mediato	56
4.4. Risposta apoptotica	57
5. Valutazione degli interattori molecolari della PLC β 1b nel modello FELC-PLC β 1b	63
Discussione	73
Bibliografia	78

INTRODUZIONE

1. Emopoiesi

Il termine **emopoiesi** o **ematopoiesi** (dal greco antico: αἷμα "sangue"; ποιεῖν "fare") si riferisce all'insieme dei processi che conducono alla formazione e alla maturazione di tutti i tipi di cellule del sangue a partire dai loro precursori.⁽¹⁾

Si può distinguere una emopoiesi **prenatale** (suddivisa in 4 fasi: mesoblastica, epatica, splenica e mieloide) e una **postnatale**. Durante lo sviluppo fetale, l'emopoiesi si svolge dapprima nel sacco vitellino, successivamente nel fegato e nella milza. Nell'essere umano adulto le cellule ematiche sono invece formate esclusivamente nel midollo osseo dello scheletro assiale in numerosi segmenti scheletrici (coste, sterno, ossa del bacino, scapole, cranio ed estremità prossimali dell'omero e del femore).⁽¹⁾ Tale processo è finemente regolato e avviene a partire da un unico tipo di cellula progenitrice multipotente, che presenta da un lato la capacità di mantenersi in numero costante (autorinnovamento) in modo che il pool di cellule staminali non si esaurisca; dall'altro quella di fornire elementi cellulari che, attraverso successivi processi di differenziazione e maturazione, daranno origine agli elementi del sangue maturi. Eritrociti, linfociti e piastrine derivano infatti da un'unica cellula staminale emopoietica pluripotente che può seguire linee di maturazione morfologicamente e funzionalmente diverse, secondo il condizionamento determinato dal tipo di stimolo o di mediatore presente.⁽²⁾ La maturazione condurrà alla generazione de:

- la **linea linfoide**, da cui si avvia la linfopoiesi (linfociti B, T e NK)
- la **linea mieloide**, da cui si avvia la mielopoiesi, l'eritropoiesi e la produzione di piastrine (granulociti, monociti, eritrociti, piastrine)

Tutte le cellule del sangue derivano da cellule staminali emopoietiche **pluripotenti** che oltre a mantenere la loro popolazione possono produrre due tipi di cellule staminali emopoietiche **multipotenti**: CFU-S e CFU-Ly. Il tipo CFU-S è precursore della linea mieloide: eritrociti, granulociti, monociti e piastrine; il tipo CFU-Ly è precursore delle cellule della linea linfoide (cellule B e T). Le cellule **progenitrici** che derivano dalle CFU sono **unipotenti**, cioè formano una sola linea cellulare. Le cellule precursori che derivano dalle progenitrici perdono la capacità di autoriprodursi (Figura 1).^(2, 3)

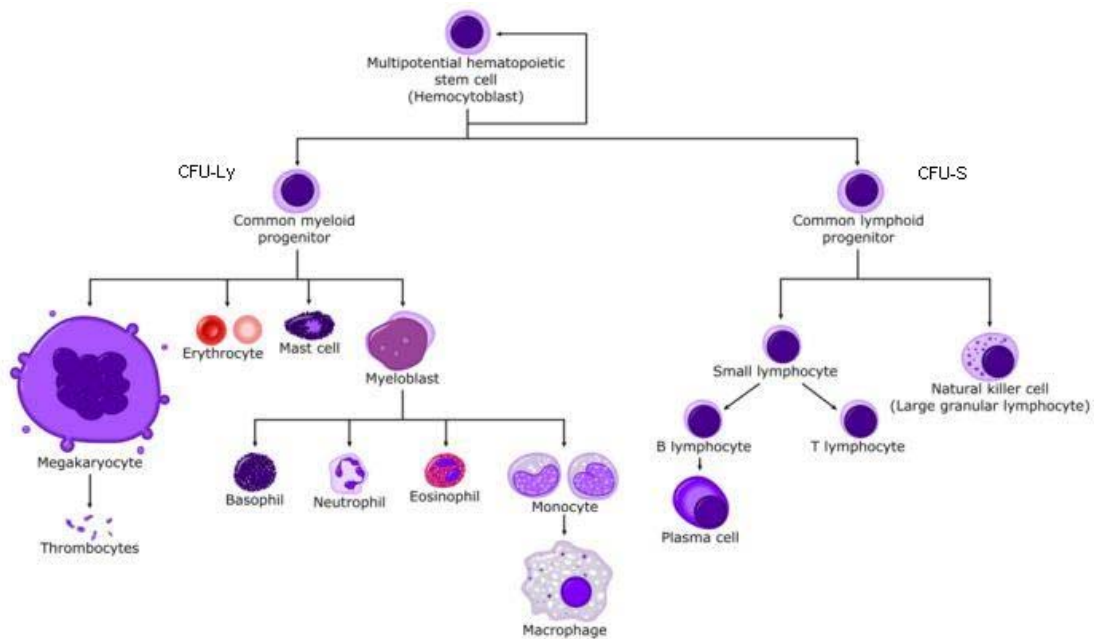


Figura 1. Rappresentazione schematica del differenziamento emopoietico: a partire da un'unica cellula staminale multipotente si generano i due precursori che danno origine alla linea mieloide e linfoide

A partire da questa cellula staminale avvengono una serie di tappe, sequenziali e ordinate, di crescita e maturazione cellulare. I fattori responsabili della sintesi dei vari elementi cellulari a partire da un unico progenitore sono in gran parte sconosciuti. Negli ultimi anni sono stati individuati numerosi fattori presenti nel microambiente ematopoietico che sembrano coinvolti in questo complesso meccanismo regolatore, indicati con la sigla CSF (*Colony Stimulating Factors*). È evidente, infatti, come sia i monociti circolanti che i macrofagi tissutali producono CSF che stimolano la crescita midollare di monociti e granulociti neutrofilici. È inoltre dimostrato che l'interleuchina-3 è un CSF multipotente, in grado di stimolare la proliferazione di eritrociti, megacariociti e mastcellule, e che l'interleuchina-1 interviene con effetti analoghi in uno stadio più avanzato dello sviluppo cellulare. Possiamo infine ricordare la presenza di CSF specifiche per gli eritrociti (eritropoietina) e per i megacariociti (trombopoietina).⁽⁴⁾ (Figura 2)

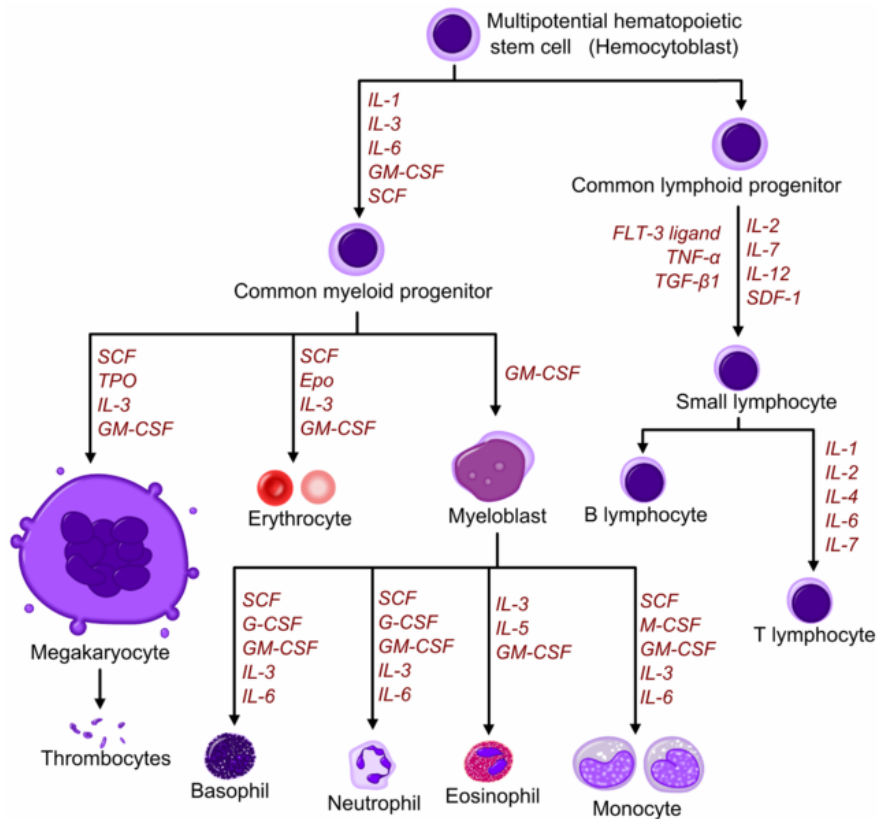


Figura 2. Schema dell’ematopoiesi in cui sono messi in risalto i diversi fattori di crescita necessari per il differenziamento ematopoietico *in vitro*. SCF= Stem Cell Factor; Tpo=Thrombopoietin; IL= Interleukin; GM-CSF= Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor; Epo= Erythropoietin; M-CSF= Macrophage-colony stimulating factor; G-CSF= Granulocyte-colony stimulating factor; SDF-1= Stromal cell-derived factor-1; FLT-3 ligand= FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; TNFα= Tumour necrosis factor-alpha; TGFβ =Transforming growth factor beta

Questi fattori di crescita danno avvio alla trasduzione del segnale, attivando fattori di trascrizione che a loro volta attivano geni che determinano il differenziamento delle cellule del sangue. Sono stati isolati numerosi fattori di trascrizione che regolano la differenziazione lungo le linee cellulari più importanti: per esempio, PU1 avvia il differenziamento mieloide; GATA-1 ha un ruolo essenziale nel differenziamento eritropoietico e magacariocitico mentre Ikaros, Ailos e Helios svolgono un ruolo importante nello sviluppo linfatico.⁽⁵⁾

2. Leucemia

Con il termine leucemia (dal greco leukos λευκός, "bianco"; aima αίμα, "sangue") si indica un insieme di neoplasie maligne caratterizzate dalla proliferazione clonale e incontrollata di cellule emopoietiche immature. A seconda della linea cellulare verso cui evolve il clone leucemico si parla di leucemia **mieloblastica** (LM) o leucemia **linfoblastica** (LL).⁽⁶⁾

All'interno di queste due suddivisioni si fa un'altra importante distinzione basata sul decorso della malattia: distinguiamo pertanto leucemie **acute** e leucemie **croniche**. La forma acuta è caratterizzata da un rapido aumento del numero di cellule immature del sangue; questo impedisce al midollo osseo di produrre cellule del sangue sane. In questi casi è richiesto un intervento immediato, per impedire che le cellule maligne entrino in circolo e vadano a diffondere in altri organi del corpo. Queste forme aggressive si manifestano soprattutto nei bambini, nel primo decennio di età. La leucemia cronica è anch'essa caratterizzata da un eccessivo accumulo di globuli bianchi, ma la proliferazione è più lenta. Queste forme sono tipiche dell'età adulta, con picchi di incidenza intorno agli 80 anni, ma possono teoricamente verificarsi in qualsiasi fascia di età.^(6,7)

Clinicamente e patologicamente, la leucemia è suddivisa in una serie di grandi gruppi.
(Tabella 1)

CLASSIFICAZIONE PRINCIPALE LEUCEMIE		
<i>Tipo cellulare</i>	<i>Acuta</i>	<i>Cronica</i>
Leucemia Linfocitaria (o "linfoblastica")	Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA)	Leucemia Linfoblastica Cronica (LLC)
Leucemia Mielogenica (o "mieloide" o "non linfocitaria")	Leucemia Mieloide Acuta (AML)	Leucemia Mieloide Cronica (LMC)

Tabella 1. Classificazione principale delle leucemie

All'interno di ciascuna di queste quattro categorie principali, ci sono in genere diverse sottocategorie. Infine, alcuni tipi più rari di leucemia sono di solito considerati al di fuori di questo schema di classificazione.

- **Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA)**. E' il tipo più comune di leucemia nei bambini piccoli, ma colpisce anche gli adulti mediamente dopo il sessantacinquesimo anno di vita. Il trattamento standard implica chemioterapia e radioterapia, con tassi di sopravvivenza pari all' 85% nei bambini e al 50% negli adulti.⁽⁸⁾ I sottotipi includono leucemia linfoblastica acuta da precursore B, leucemia linfoblastica acuta da precursore T, leucemia di Burkitt e leucemia acuta bifenotipica.
- **Leucemia Linfoblastica Cronica (LLC)**. Colpisce prevalentemente gli adulti di età superiore ai 55 anni, quasi mai i bambini, ed è più frequente negli individui di sesso maschile. Il tasso di sopravvivenza dopo 5 anni è stimato essere del 75%.⁽⁸⁾ Uno dei sottotipi è la più aggressiva leucemia prolinfocitica a cellule B.
- **Leucemia Mieloide Acuta (AML)**. Si verifica più frequentemente negli adulti di sesso maschile. Trattata mediante chemioterapia, ha un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 40%.⁽⁸⁾ La classificazione FAB (Franco-Americana-Britannica) ha proposto una suddivisione in categorie sulla base di caratteristiche istologiche e morfologiche. (Figura 3) Le sottoclassi includono leucemia promielocitica acuta, leucemia mieloblastica acuta e leucemia magacarioblastica acuta.
- **Leucemia Mieloide Cronica (LMC)**. Si verifica principalmente negli adulti e molto più raramente nei bambini. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni è del 90%.⁽⁸⁾ Un sottotipo è la leucemia cronica monocitica.

Il quadro clinico delle leucemie è dovuto essenzialmente all'invasione del midollo da parte del clone neoplastico e alla conseguente distruzione delle cellule emopoietiche normali: il paziente affetto da leucemia sviluppa dunque anemia per insufficiente produzione di globuli rossi, infezioni frequenti e gravi per ridotta produzione di globuli bianchi ed emorragie per ridotta produzione di piastrine.^(6, 7)

Le cause che provocano tali neoplasie non sono ancora del tutto chiare. Attualmente sono noti alcuni fattori di rischio, come radiazioni ionizzanti, benzene, agenti alchilanti, fumo di sigaretta, mutazioni genetiche predisponenti e infezioni virali. Inoltre le persone con anomalie cromosomiche o alcune altre condizioni genetiche hanno un rischio maggiore di leucemia. Per

esempio, le persone con sindrome di Down o con anemia di Fanconi hanno un rischio significativamente aumentato di sviluppare forme di leucemia acuta, soprattutto leucemia mieloide.^(9,10,11)

SIGLA	CATEGORIA	CRITERI MORFOLOGICI
M0	INDIFFERENZIATA	MPO <3% ma mostra granulazioni caratteristiche al microscopio elettronico; NAE negativa
M1	MIELOBLASTICA SENZA MATURAZIONE	Blasti >90% nel midollo esclusi eritroblasti; <10% componente monocitaria; <10% granulociti, MPO >3%
M2	MIELOBLASTICA CON MATURAZIONE	Blasti 30<90%; granulociti >10%; monociti <20% (NE), MPO >3%
M3	PROMIELOCITICA (APL)	>20% promielociti anomali ipergranulari (corpi di Auer), MPO>3%;
M3V	PROMIELOCITICA VARIANTE IPOGRANULARE (APL _v)	Nuclei reniformi, granulazioni fini nel citoplasma, poco visibili al MO, ma MPO +++ , MPO >3%
M4	MIELOMONOCITICA	Blasti >30%, NE componente granulocitaria 20<80%, componente monocitaria 20<80%, >5x10 ⁹ /l monociti nel sangue periferico o lisozima elevato, MPO >3%
M4 eo	MIELOMONOCITICA CON IPEREOSINOFILIA	Criteri per M4 associati a eosinofili anormali con granuli eosinofili e basofili, MPO >3%
M5	MONOCITICA	>80% NE componente monocitaria; NAE positiva
M5a	MONOCITICA SENZA DIFFERENZIAZIONE (MONOBLASTICA)	>80% NE componente monocitaria; monoblasti >80% della componente monocitaria, NAE positiva
M5b	MONOCITICA CON DIFFERENZIAZIONE	>80% NE componente monocitaria; monoblasti <80% della componente monocitaria NAE positiva
M6	ERITROLEUCEMIA	Cellule eritroidi >50% delle cellule midollari; blasti >30% NE
M7	MEGACARIOBLASTICA	Blasti >30% NE; megacarioblasti, <i>blebs</i> , (mielofibrosi)

Figura 3. Suddivisione istochimica-morfologica delle leucemie mieloidi acute sulla base della classificazione FAB ⁽¹²⁾

In molte neoplasie ematopoietiche alcune specifiche traslocazioni cromosomiche correlano con caratteristiche cliniche, immunoistochimiche e morfologiche, diventando così non solo segni distintivi della malattia ma veri e propri eventi promotori nella patogenesi.

In particolare, la traslocazione reciproca tra i cromosomi umani 9 e 22 genera il cosiddetto cromosoma Philadelphia associato all'insorgenza di leucemia mieloide cronica: il gene *bcr* sul cromosoma 22 si fonde con il proto-oncogene *c-abl* sul cromosoma 9, e la proteina di fusione che viene così sintetizzata, BCR-ABL, è dotata di attività enzimatica tirosin-chinasica in grado di indurre proliferazione incontrollata dei mieloblasti. (Figura 4) Infatti il gene *bcr-abl* è sempre attivo ed è responsabile della produzione continua di leucociti che si accumulano nel sangue e nei tessuti portando al quadro clinico tipico della leucemia mieloide cronica. Il cromosoma Philadelphia viene infatti osservato nel 90% dei pazienti affetti da LMC.⁽¹³⁾

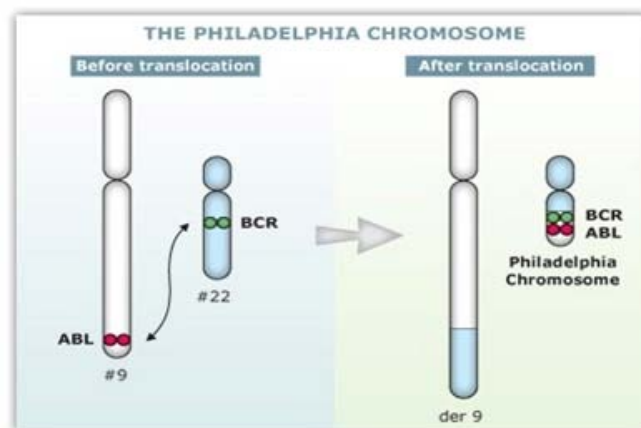


Figura 4. Una traslocazione reciproca tra il cromosoma 9 e il 22 genera il cosiddetto cromosoma Philadelphia, associato all'insorgenza di leucemia mieloide cronica

Dal punto di vista terapeutico, la leucemia acuta non trattata ha una prognosi rapidamente infausta, ma risultati soddisfacenti sono stati raggiunti con la chemioterapia e il trapianto di midollo osseo, tanto da raggiungere in alcuni casi una completa guarigione; la leucemia cronica presenta invece quadri molto eterogenei, e la prognosi è molto variabile.^(6, 7)

3. Signaling inositide-dipendente

Riveste ad oggi un notevole interesse il *pathway* di trasduzione del segnale che prevede l'azione di componenti del ciclo dei polifosfoinositidi come secondi messaggeri. I polifosfoinositidi sono infatti componenti intermedi nella trasmissione degli stimoli extracellulari derivanti dall'attivazione di specifici recettori.⁽¹⁴⁾ Questi messaggeri sono sintetizzati attraverso vie di trasduzione del segnale molto complesse: il recettore si trova solitamente integrato nella membrana plasmatica ed interagisce con la molecola di *signaling* sul lato extracellulare. Tale interazione provoca una variazione strutturale del recettore, che assume così una conformazione idonea al legame con altre proteine situate sul versante citoplasmatico della membrana. Si attiva in questo modo una cascata intracellulare in risposta allo stimolo iniziale. I fosfoinositidi comprendono una famiglia di otto lipidi minori di membrana che giocano ruoli fondamentali in diversi meccanismi di trasduzione del segnale nella cellula.^(15,16) Tali lipidi sono fosfatidilinositolo (PI), PI(3)P, PI(4)P comunemente detto PIP, PI(5)P, PI(3,4)P2, PI(3,5)P2, PI(4,5)P2 definito PIP2 e PI(3,4,5)P3 definito PIP3. Le fosforilazioni a livello del PI possono avvenire in posizione 3, 4, 5 ad opera di differenti fosfoinositide-chinasi. (Figura 5)

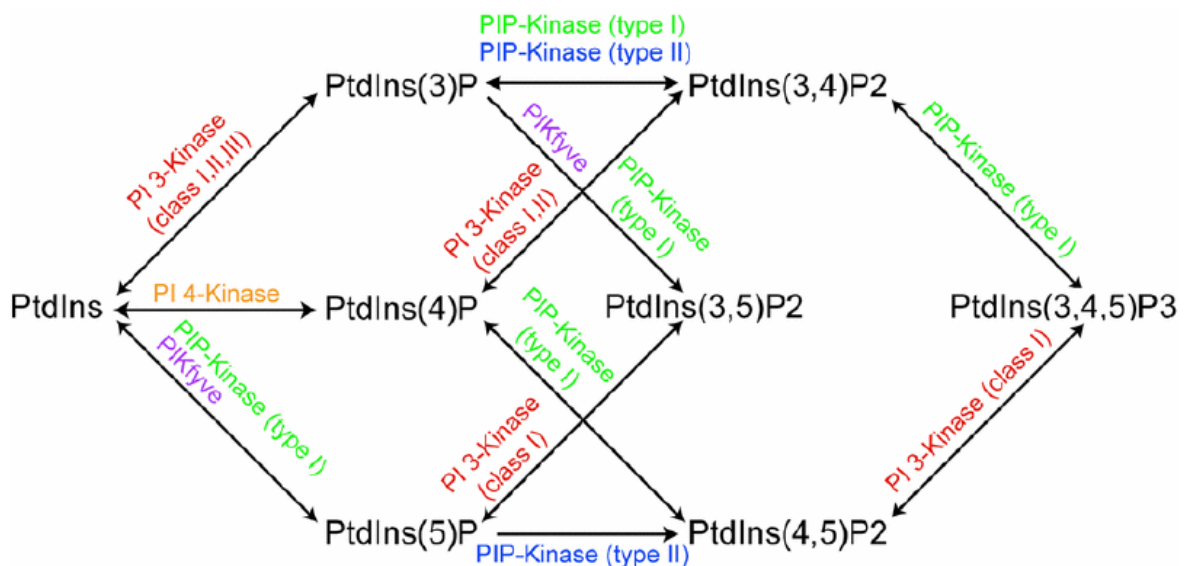


Figura 5. Principali vie di sintesi dei fosfoinositidi nelle cellule di mammifero. Alcune di queste vie sono state osservate *in vitro*, ma non *in vivo*

L'unità strutturale comune a tutti i fosfolipidi dell'inositolo è il fosfatidil-1-D-mio-inositolo (PI), molecola formata dal mioinositolo, unito mediante un legame fosfodiesterico ad una molecola di diacilglicerolo (DAG). I due acidi grassi del DAG (in genere stearico e arachidonico) ancorano la struttura alla membrana plasmatica. Il PI è prodotto a livello del reticolo endoplasmatico a partire dall'acido fosfatidico (PA) e dal mioinositolo secondo una via di sintesi *de novo* composta da due fasi: inizialmente, il PA reagisce con il citosin-trifosfato (CTP) per formare citosin-monofosfato-PA (CMPPA) e pirofosfato. Poi, il CMPPA reagisce con il mioinositolo producendo PI e CMP. Il PA deriva, a sua volta, dal DAG a cui viene ceduto il γ -fosfato dell'ATP.⁽¹⁵⁾

Diverse fosfoinositide-chinasi, come già anticipato, possono agire a livello delle posizioni 3, 4, 5 del PI generando gli altri sette componenti della famiglia. A differenza di altre famiglie di protein-chinasi, quelle specifiche per i fosfoinositidi presentano omologie di sequenza a livello del dominio catalitico, suggerendo che il meccanismo di trasferimento dei gruppi fosfato sia comune. Proteine omologhe alle fosfoinositide-chinasi degli animali sono state identificate anche nelle piante, a dimostrazione del fatto che la funzione di *signaling* è ubiquitaria e conservata nel corso dell'evoluzione.^(15,16) Tra i prodotti delle fosfoinositide-chinasi, il PIP2 è sicuramente una molecola chiave poiché precursore di tre importanti secondi messaggeri: l'inositolo 1,4,5- P_3 (IP3) che modifica i livelli di Ca^{2+} intracellulare, il DAG e il PIP3 che è in grado di attivare la protein chinasi B (conosciuta anche come Akt). La proteina Akt ha attività anti-apoptotica fosforilando specifici substrati; dal punto di vista strutturale presenta un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) ad alta affinità per il PIP3.

L'enzima responsabile della genesi di DAG e dell'IP3 è la fosfolipasi C fosfoinositide-dipendente, definita PI-PLC o più brevemente PLC. L'idrolisi del PIP2 catalizzata dalla PLC è uno degli eventi iniziali nella regolazione di numerose funzioni cellulari da parte di un centinaio di molecole di *signaling* extracellulare: questa reazione produce il DAG e l'IP2 ciclico, che viene poi convertito in IP3. Mentre il DAG rimane associato alla membrana plasmatica, l'IP3, una piccola molecola polare che viene rilasciata nel citoplasma, agisce inducendo il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari.^(15,16) Il DAG, che può essere generato da altri lipidi, come ad esempio la fosfatidilcolina, può svolgere diverse funzioni: scindersi per produrre acido arachidonico (precursore delle prostaglandine), oppure legare la protein-chinasi-C (PKC) per aumentarne l'affinità al Ca^{2+} . La PKC attivata fosforila altre proteine cellulari procedendo nella via di trasduzione del segnale. (Figura 6)

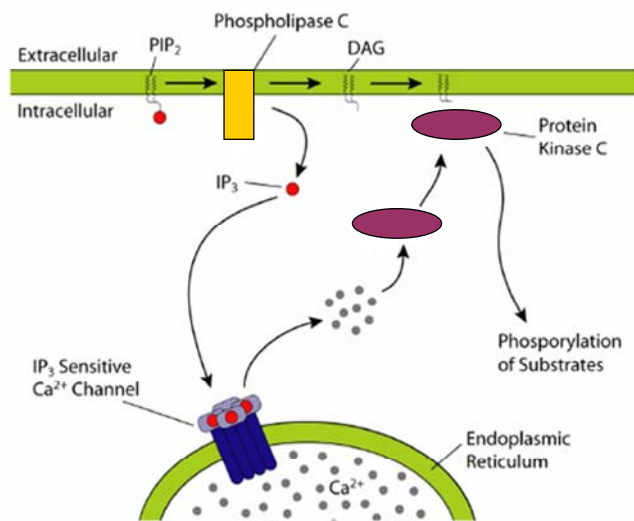


Figura 6. L'idrolisi del PIP2 catalizzata dalla PLC genera due distinti messaggeri secondari: il DAG e l'IP3

Il metabolismo degli inositidi non è limitato alla membrana plasmatica: i lipidi dell'inositolo interagiscono anche con proteine del citoscheletro e la loro presenza è stata rilevata nel compartimento nucleare. La presenza dei polifosfoinositidi e degli enzimi coinvolti nel loro metabolismo a livello del nucleo, fa sì che si possa parlare di sistema nucleare di trasduzione del segnale inositide-dipendente.^(17,18) E' necessario sottolineare che il metabolismo degli inositidi nucleari ha una regolazione indipendente rispetto a quello della membrana plasmatica, ed è modulato da stimoli di breve durata con fattori di crescita che agiscono sulla progressione del ciclo cellulare e durante il differenziamento.⁽¹⁹⁾ Il ruolo del metabolismo nucleare degli inositidi nella genesi di messaggeri secondari è ormai largamente accettato. Va ricordato che recenti evidenze sperimentali indicano che il fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato (PtdIns(4,5)P2) nucleare può influenzare direttamente fenomeni quali splicing del mRNA, struttura della cromatina e trascrizione genica.⁽¹⁹⁾

Lo stato chimico-fisico degli inositidi nucleari è a tutt'oggi sconosciuto. I fosfoinositidi sono presenti in preparazioni di nuclei ottenute con tamponi contenenti detergenti: ciò indica che questi lipidi potrebbero non essere parte di nessun tipo di doppio strato lipidico classico. E' noto che da preparazioni di citoscheletro estratto con Triton X-100 si ottengono lipidi dell'inositolo, e si ritiene che essi siano legati a proteine, alcune delle quali già identificate (profilina, cofilina, gelsonina, gCap, alfa-actinina, vinculina e filamina). Pertanto gli inositidi nucleari potrebbero interagire con proteine della matrice nucleare, considerata da alcuni autori equivalente al citoscheletro.⁽¹⁹⁾ Tra le strutture nucleari che potrebbero essere coinvolte nel legame degli

inositidi vi sono gli *speckles*, compartimenti subnucleari ricchi di piccole particelle ribonucleoproteiche e diversi fattori di *splicing*.^(20,21) A livello degli *speckles* sono concentrati parecchi elementi del metabolismo dei fosfoinositidi nucleari, tra i quali il PtdIns(4,5)P₂.^(22,23,24,25) Di recente è stata immunolocalizzata negli *speckles* nucleari la profilina, la quale potrebbe agire come proteina legante il PtdIns(4,5)P₂.⁽²⁶⁾ Inoltre è stato dimostrato che ING2 (inibitor of growth protein 2) agisce come recettore nucleare per PtdIns(5)P a livello della sua regione PDH (plant homeodomain), con struttura simile a uno "zinc finger".⁽²⁷⁾ E infine, nei nuclei di neuroni è stata identificata una proteina legante il fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃).⁽²⁸⁾

In conclusione, il ciclo nucleare dei fosfoinositidi non è semplicemente una duplicazione di ciò che avviene sulla membrana plasmatica, ma risponde a stimoli differenti e può modulare diversi processi cellulari, come illustrato nella figura Figura 7.⁽²⁹⁾

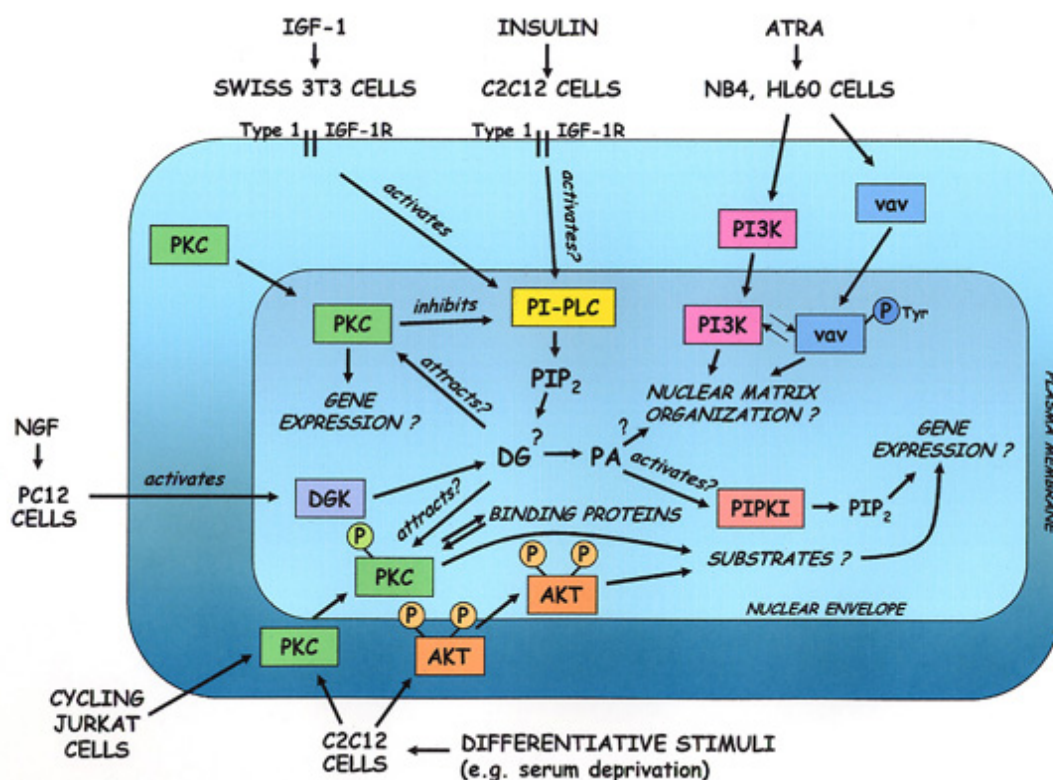


Figura 7. Signaling fosfolipidico nucleare in diversi modelli cellulari

4. Fosfolipasi C (PLC)

La fosfolipasi C β 1 (PI-PLC β 1) è l'isoforma maggiormente associata al ciclo nucleare dei fosfoinositidi ed è un enzima-chiave nella trasduzione del segnale lipidico. Appartiene alla superfamiglia delle fosfolipasi; ad oggi nei mammiferi sono state identificate almeno 13 isoforme di PLC, suddivise in sei famiglie: - β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ ed - η . (Figura 8)

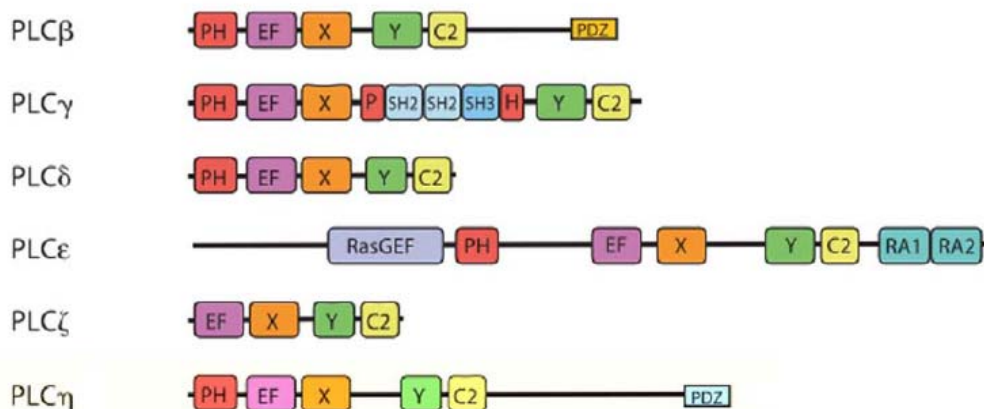


Figura 8. Organizzazione dei domini presenti nelle isoforme delle PLC

Tutte queste isoforme differiscono nella loro organizzazione strutturale, nei meccanismi di regolazione, di attivazione e nella loro distribuzione tissutale.⁽³⁰⁾ 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 Ca²⁺ per la loro attività enzimatica, fino alle forme più complesse presenti negli eucarioti superiori, che si ritengono derivare da una PLC ancestrale.⁽²⁹⁾ Il peso molecolare di questi enzimi varia dai 70-75 kilodalton (kDa) dell'isoforma ζ ⁽³¹⁾ agli 85 kDa delle PLC- δ , ai 120-155 kDa delle isoforme β , γ e η , per arrivare ai 230-260 kDa della PLC- ϵ .

Dal punto di vista strutturale, il core catalitico di tutte le PLC è costituito dall'associazione tra i domini X e Y; Il confronto delle sequenze aminoacidiche delle diverse isoforme ha rivelato che le sequenze primarie di questi enzimi sono scarsamente conservate, fatta eccezione per i domini X e Y che presentano un'omologia di sequenza del 60% circa.⁽³²⁾

Le isoforme delle famiglie β , γ , δ ed η contengono tutte un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) nella regione N-terminale.⁽³³⁾ 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.⁽³⁴⁾

Delle PLC finora identificate, le quattro 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 nucleare.⁽³⁵⁾ Anche membri della famiglia delle PI-PLC-gamma sono presenti a livello nucleare, ma non presentano il classico segnale di localizzazione nucleare (NLS).

5. PI-PLC β 1

Nei mammiferi sono stati identificati quattro isotipi di PI-PLC β e differenti varianti prodotte per *splicing* alternativo. Il meccanismo di attivazione di questi enzimi è mediato da proteine G eterotrimeriche, inoltre presentano un'elevata attività GTPasica.⁽³⁵⁾ Le isoforme *beta* presenti nei mammiferi sono diversamente distribuite a livello tissutale, in particolare la PI-PLC β 1 localizza in specifiche regioni cerebrali. A livello citoplasmatico, le PI-PLC β agiscono come effettori molecolari in seguito all'attivazione di recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle rodopsine.

La PI-PLC β 1 esiste in due varianti prodotte per *splicing* alternativo, la PI-PLC β 1a e la PI-PLC β 1b, che differiscono a livello dei residui aminoacidici C-terminali. E' ormai noto che la PI-PLC β 1 è l'isoforma prevalente a livello nucleare in diversi modelli cellulari e che la porzione C-terminale è fondamentale per la sua localizzazione all'interno del nucleo.⁽³⁶⁾

In particolare, è stato visto che la PI-PLC β 1 è localizzata 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.^(37, 38) Questo comportamento è spiegato dal fatto che rappresentano siti di accumulo per fattori di *splicing*, piccole ribonucleoproteine (snRNP) e forme iperfosforilate di RNA polimerasi II e giocano quindi un ruolo importante nell'associazione tra meccanismo di trascrizione e *splicing* post-trascrizionale. All'interno di queste strutture, è presente non solo la PI-PLC β 1, ma anche altre molecole chiave del *signaling* lipidico localizzano a livello degli *speckles* nucleari (PIP2, DGK τ , PI-PLC δ 4, PI3K C2 α , PTEN e SHIP2). In particolare, è stata dimostrata l'interazione tra PI-PLC β 1, DGK τ e PIPK α .^(39, 40)

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 PIP2 regoli questo meccanismo interagendo con il *core* enzimatico dello spliceosoma o con proteine citoscheletriche, come la proteina 4.1, presenti negli *speckles*, oppure che il PIP2 agisca come substrato di PI-PLC β 1, dando avvio alla cascata di trasduzione che vede come secondi messaggeri IP3 e DAG.⁽⁴¹⁾

5.1. STRUTTURA DEL GENE DELLA PI-PLC β 1

Negli ultimi anni, diversi studi si sono concentrati sulla caratterizzazione molecolare del gene per la PI-PLC β 1.^(42, 43) Mediante la tecnica di Ibridazione Fluorescente *in situ* (FISH), il gene che codifica per la PI-PLC β 1 è stato mappato sul braccio corto del cromosoma 20, nel locus 20p12.3, in un intervallo di 1.9 cM delimitato dai marcatori D20S917 a 25 cM e D20S177 a 26.9 cM.⁽⁴³⁾ Il gene dista meno di 1Mb dal gene che codifica per la PI-PLC β 4 (locus 20p12.3), un'altra fosfolipasi umana la cui regolazione è totalmente indipendente da quella della PI-PLC β 1. Il gene della PI-PLC β 1 copre una regione sul genoma di 250 kbp ed è formato da 36 piccoli esoni e 35 introni molto grandi.⁽⁴³⁾

Dallo stesso gene si producono due isoziimi, denominati 'a' e 'b', che si formano per la presenza di un sito di *splicing* alternativo presente nella regione 5'-UTR oppure nella regione 3'-UTR.^(36,44) Come mostrato in Figura 9, se il sito di *splicing* si trova nella regione 5'-UTR, nell'isozima 'b' è presente un esone aggiuntivo contenente un codone di stop che induce la formazione di una proteina tronca che ha un peso molecolare di circa 140 kDa, mentre l'isozima 'a' dà origine ad una proteina di circa 150 kDa. Se invece il sito di *splicing* alternativo è presente nella regione 3'-UTR, si ha la formazione di una diversa regione 3'-UTR che dà origine ad un altro isozima 'b', che produce anch'esso una proteina più corta. Oltre al peso molecolare, le due proteine differiscono anche per la diversa localizzazione cellulare, in quanto la PI-PLC β 1b si trova prevalentemente nel nucleo, mentre la PI-PLC β 1a è uniformemente distribuita tra nucleo e citoplasma.⁽⁴⁵⁾

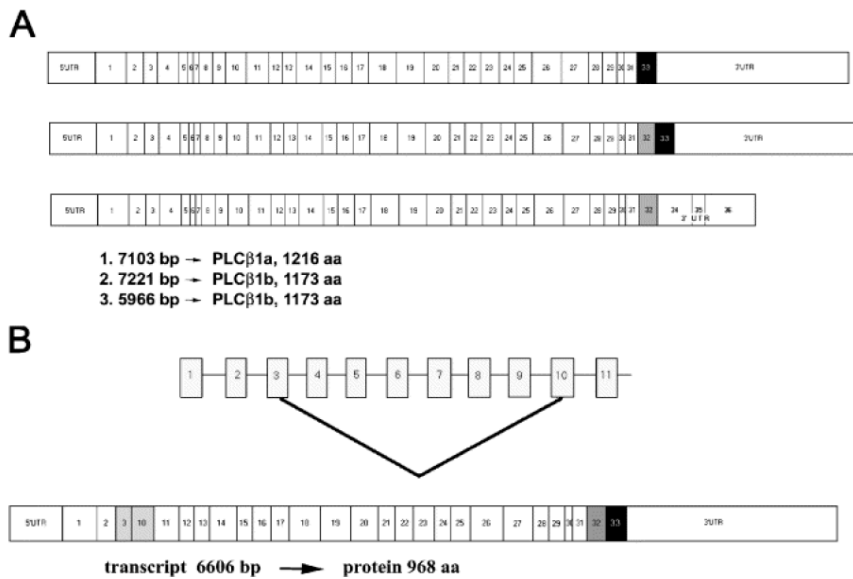


Figura 9. Pannello A: struttura del cDNA della PLCβ1a e PLCβ1b nell'uomo. In alto: PLCβ1a; al centro: PLCβ1b; in basso: PLCβ1b con una diversa 3'-UTR. Pannello B: struttura della variante di splicing in cui mancano gli esoni 4, 5, 6, 7, 8, 9

5.2. STRUTTURA PROTEICA DELLA PI-PLCβ1

La PI-PLCβ1 si trova nella cellula sottoforma di due isozimi (PI-PLCβ1a e PI-PLCβ1b) che agiscono come effettori a valle di recettori di membrana associati a proteine G (GPCR).^(46,47)

Le sequenze proteiche di entrambi gli isozimi presentano alcune strutture fondamentali. La porzione centrale è costituita infatti da due domini altamente conservati (X e Y) che formano il sito catalitico dell'enzima, intorno ai quali si organizzano altre regioni funzionali, rappresentate da domini PH, domini *EF-hand* e un singolo dominio a motivo C2. Inoltre, sono presenti alcune sequenze funzionalmente molto importanti, rappresentate dal segnale di localizzazione nucleare (NLS), di attivazione dell'enzima a livello nucleare e di terminazione dell'attivazione.⁽³⁶⁾

(Figura 10)

Come evidenziato in precedenza, le due proteine differiscono per la localizzazione cellulare, in quanto la PI-PLCβ1b si trova prevalentemente nel nucleo, mentre la PI-PLCβ1a è uniformemente distribuita tra nucleo e citoplasma. Inoltre, è importante sottolineare il fatto che in questi due compartimenti cellulari i meccanismi di attivazione della PI-PLCβ1 risultano essere totalmente indipendenti. A livello citoplasmatico la PI-PLCβ1 viene attivata grazie all'interazione con la subunità Gαq attivata delle proteine G.⁽⁴⁶⁾ Infatti, tale subunità interagisce con il dominio

C2 e i residui della regione C-terminale ⁽⁴⁷⁾ della PI-PLC β 1 ancorata a livello della membrana plasmatica in seguito all'interazione del suo dominio PH con il fosfatidil-inositolo-3,4,5 trisfosfato (PIP3).⁽⁴⁸⁾ A livello nucleare, invece, l'attivazione della PI-PLC β 1 sembra riconducibile alla fosforilazione di una sequenza consenso (P-S-S-P), situata a livello dei residui aminoacidici 980-983, in corrispondenza della regione C-terminale. Tale sequenza viene di solito fosforilata da una chinasi (MAPK) il cui substrato naturale è rappresentato da proteine che inducono la mitosi cellulare. Infatti, in fibroblasti di topo Swiss 3T3 trattati con IGF-1, che provoca la traslocazione nucleare della p42/44 MAPK attivata, si osserva una iper-fosforilazione del residuo Ser982 della PI-PLC β 1 nucleare.^(49,50) La sostituzione di questo residuo con una glicina blocca l'attivazione della PLC β 1, fornendo così una possibile prova a favore di questo meccanismo d'attivazione.⁽⁵¹⁾

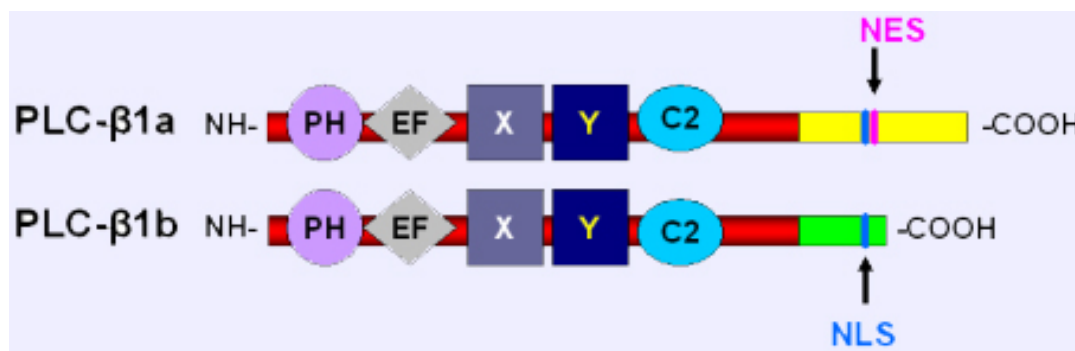


Figura 10. Domini funzionali delle due isoforme proteiche PLC β 1a e PLC β 1b. PH= Pleckstrin Homology Domain; EF= EF-Hand Domain; X and Y= Catalytic Domain; C2= Calcium-binding Domain; NLS= Nuclear Localisation Signal; NES= Nuclear Export Signal

5.3. REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA PI-PLC β 1

A livello citoplasmatico, l'attivazione della PI-PLC β 1 è mediata da proteine G eterotrimeriche, sia da parte della subunità $G\alpha q/\alpha 11$ che $G\beta/\gamma$ che agiscono 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.⁽⁵²⁾

La PI-PLC β 1 catalizza l'idrolisi del fosfatidil-inositolo 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P2), inducendo la formazione di diacilglicerolo (DAG) e di inositolo-1,4,5-trisfosfato (Ins(1,4,5)P3), che a loro volta agiscono da secondi messaggeri attivando bersagli specifici, coinvolti nei processi di segnalazione che regolano il differenziamento e la proliferazione cellulare.⁽⁵³⁾ In particolare, è

stato osservato che la PI-PLC β 1 nucleare induce la traslocazione della proteina chinasi C (PKC) nel nucleo, dove fosforila alcuni bersagli nucleari, tra cui fattori di trascrizione. Di conseguenza l'alterazione della regolazione del ciclo lipidico della PI-PLC β 1 nucleare può avere effetti importanti sulla cancerogenesi e sulla progressione tumorale. Per questo motivo, si è cercato di analizzare il ruolo della PI-PLC β 1 in diversi sistemi cellulari tumorali.

Studi condotti su fibroblasti murini (Swiss 3T3) hanno dimostrato che la PI-PLC β 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.^(49,50) Si sono infatti osservate in seguito a stimolazione con *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), l'attivazione e la traslocazione nucleare di MAPK che fosforila la PLC β 1 a livello della Ser982 nel dominio C-terminale; questa fosforilazione non è di per sé sufficiente per l'attivazione dell'enzima, ma probabilmente è un segnale per il reclutamento di altri elementi regolatori fondamentali per la mitogenesi.^(50,54) In questo sistema biologico, è inoltre dimostrato che la PI-PLC β 1 è inibita da un'altra fosforilazione, ad opera della *protein kinasi C alpha* (PKC- α) che viene richiamata nel nucleo da DAG.

Inoltre, si è visto che la PI-PLC β 1 nucleare regola l'attivazione della progressione del ciclo cellulare a livello del *checkpoint* nella fase G1. In particolare, nelle cellule di eritroleucemia murina di Friend (FELC), è stato osservato che la overespressione dell'enzima è correlata all'attivazione del sistema ciclina D3/cdk4 che fosforila la proteina pRb, la quale a sua volta attiva il fattore di trascrizione E2F-1.⁽⁵⁵⁾ Questo fenomeno porta quindi ad una regolazione negativa del differenziamento delle cellule di Friend, per cui la proliferazione cellulare è costantemente attivata.⁽⁵⁶⁾

Tuttavia, la regolazione del differenziamento cellulare non mantiene un comportamento simile in tutti i sistemi biologici; ad esempio nel sistema di mioblasti murini C2C12, si è visto che l'espressione della PI-PLC β 1 aumenta durante il differenziamento miogenico,⁽⁵⁷⁾ esattamente il contrario di ciò che è stato osservato durante il differenziamento eritroide delle cellule di Friend.⁽⁵⁸⁾ Infine, mediante l'uso delle tecniche di microarray, è stata analizzata di recente l'espressione dei geni in cellule di eritroleucemia murina di Friend in cui era stata indotta la overespressione della PI-PLC β 1.⁽⁵⁹⁾ In particolare, in questo sistema, è stato evidenziato che uno dei bersagli molecolari della PI-PLC β 1 è la molecola CD24, di cui già si conosce il ruolo non solo nella biologia dei tumori,⁽⁶⁰⁾ ma anche a livello dei meccanismi di proliferazione e differenziamento delle cellule emopoietiche.^(59, 61)

Pertanto, in risposta a una varietà di segnali, l'attivazione/disattivazione della PI-PLC β 1 genera vie differenti di PtdIns, PtdIns(4,5)P2 e DAG all'interno del nucleo.

5.4. RUOLO DELLA PI-PLC β 1 NEI DISORDINI EMATOPOIETICI

Recenti ricerche hanno messo in evidenza una correlazione statisticamente significativa tra la presenza della delezione mono-allelica del gene della PI-PLC β 1 e l'*outcome* clinico in pazienti affetti da sindrome mielodisplastica (MDS).⁽⁶²⁾ Attraverso la metodica FISH, è stato infatti dimostrato che tra i pazienti affetti da MDS quelli che hanno la delezione criptica mono-allelica del gene della PI-PLC β 1 hanno un *outcome* clinico peggiore, con una maggiore probabilità di evolvere in AML, rispetto a pazienti che invece hanno entrambi gli alleli. Inoltre, si è visto che la presenza della delezione correla con un'espressione differente delle due varianti di *splicing* della PI-PLC β 1 nei pazienti MDS ad alto rischio rispetto ai donatori sani, e questo potrebbe riflettersi in uno sbilanciamento nella proliferazione e nell'apoptosi. La delezione è infatti responsabile di una robusta riduzione della PI-PLC β 1b, localizzata prevalentemente nel nucleo e coinvolta nella progressione fisiologica dalla fase G1 del ciclo cellulare, il che potrebbe suggerire un ulteriore meccanismo alterato nel ciclo cellulare dei pazienti affetti da MDS.⁽⁶²⁾ Infatti, dai dati ottenuti sembra che solo la PI-PLC β 1b sia coinvolta nella progressione da MDS a AML, e questo potrebbe riflettersi in uno sbilanciamento dei meccanismi legati a proliferazione e differenziamento cellulare, essendo l'isoforma 1b quella prevalentemente nucleare e coinvolta nell'attivazione del complesso ciclina D3/cdk4, così come nella regolazione della molecola CD24.^(55,59)

5.5. RUOLO della PI-PLC β 1 nel DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE *in vitro*

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.⁽⁶³⁾ Il differenziamento eritroide può essere indotto *in vitro* mediante trattamento con DMSO (dimetilsolfossido) o altri agenti chimici planari-polari e prevede la sintesi di diverse proteine caratteristiche di questo processo, quali la β -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.⁽⁶⁴⁾ Inducendo il differenziamento delle FELC con DMSO si osserva una diminuzione dell'attività della PI-PLC β 1,⁽⁶⁵⁾ della sua espressione e della massa di DAG.⁽⁶⁶⁾ E' stato dimostrato che la localizzazione nucleare della PI-PLC β 1 è fondamentale per il differenziamento

eritroide: si è visto che l'overespressione della PI-PLC β 1 provoca un'inibizione del differenziamento eritroide indotto da DMSO, con conseguente diminuzione di espressione della β -globina, e viene inoltre quasi completamente abolita l'attività del fattore di trascrizione p45/NF-E2. Per chiarire maggiormente il ruolo della PI-PLC β 1 nel differenziamento eritroide si è studiata l'espressione del fattore di trascrizione p45/NF-E2, coinvolto nella regolazione dell'espressione del gene della β -globina. L'espressione di p45/NF-E2, che è un prerequisito del differenziamento delle cellule FELC, è indotta da DMSO. L'overespressione della PI-PLC β 1 (entrambe le forme di *splicing*) riduce l'espressione della p45/NF-E2.⁽⁶⁷⁾ L'overespressione della PI-PLC β 1 nucleare induce inoltre 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 il passaggio nella fase S.⁽⁵⁵⁾ 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 β 1 nucleare.⁽⁵⁹⁾ Con i microarrays si è confrontato l'effetto dell'overespressione della PI-PLC β 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 β 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 β 1 con il siRNA porta alla riduzione dell'espressione di CD24. Sempre nello stesso modello cellulare si è dimostrato di recente, attraverso un approccio di proteomica di espressione, che la PI-PLC β 1 nucleare 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 β 1 interagiscono direttamente a livello degli *speckles*. Queste scoperte sottolineano l'importanza della PI-PLC β 1 nucleare nel differenziamento eritroide in vitro.⁽⁶⁸⁾

5.6. RUOLO DELLA PI-PLC β 1 NELL' IGF-1 SIGNALING PATHWAY

Il fattore di crescita IGF-1 (*insulin-like growth factor*), anche chiamato somatomedina C, è un potente agente proliferativo e antiapoptotico. Se somministrato, è infatti in grado di stimolare *in vitro* la proliferazione e il differenziamento di una grande varietà di tipi cellulari,⁽⁶⁹⁾ mentre *in vivo*

è in grado di agire come intermedio in molte risposte ormonali e stimolare la crescita dell'intero animale modello.⁽⁷⁰⁾ E' stato dimostrato che livelli elevati di IGF-1 conferiscono un aumento di rischio per un certo tipo di tumori, tra cui carcinoma al seno e alla prostata.^(71, 72)

In vitro, IGF-1 e il suo recettore (IGF-1R) costituiscono quindi un potente sistema di segnalazione proliferativo che stimola la crescita e blocca il processo apoptotico in molti tipi cellulari: la sua attività proliferativa è principalmente mediata dal signaling delle MAP chinasi; mentre la sua attività anti-apoptotica è mediata dal *pathway* PI-3 chinasi.⁽⁷³⁾ IGF-1 agisce quindi come segnale mitogenico: questo avviene mediante l'associazione del recettore Tyr-chinasico con Shc, GRB2 e Sos-1 per attivare Ras e la cascata delle MAP chinasi (RAF, Mek, Erk) che modificano l'attività di fattori di trascrizione (ad esempio l'attivazione di ELK). La fosforilazione di IRS-1 e l'attivazione del *pathway* PI3K sono coinvolti anche nella segnalazione mediata da IGF-1, similmente al *signaling* mediato da insulina.^(74, 75) Uno dei bersagli a valle di IGF-1 è la repressione di proteine di resistenza allo stress, compresi gli enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi, e le proteine da *shock* termico.⁽⁷⁶⁾ E' già dimostrata in alcuni modelli cellulari l'attivazione della PI-PLC β 1 da parte del *signaling* mediato da IGF-1. Nel modello di fibroblasti murini Swiss 3T3 è stato infatti dimostrato come, in seguito a stimolazione con IGF-1, si assiste ad una rapida traslocazione nucleare di ERK, una chinasi regolata da stimoli extracellulari, che fosforila la PI-PLC β 1 nucleare sul residuo aminoacidico serina 982, a livello della sequenza *target* PSSP localizzata all'estremità C-terminale.^(49,50) (Figura 11) Mutando la sequenza *target*, sostituendo la Ser982 con una glicina (S982G), viene infatti a mancare l'effetto mitogenico di IGF-1 sulla PI-PLC β 1. La Ser982 è un residuo altamente conservato tra le diverse specie della PI-PLC β 1, ma non esiste nelle altre isoforme della famiglia β , suggerendo che la sua fosforilazione da parte di ERK sia specifica per l'isoforma β 1. Un'altra ipotesi avanzata dagli autori è che la fosforilazione da parte di ERK sulla Ser982 possa influenzare la capacità di legame della PI-PLC β 1 ad altre proteine che possono incrementarne l'attività.⁽⁵⁰⁾ In conclusione dunque la PI-PLC β 1 e la sua localizzazione nucleare rivestono un ruolo importante nella risposta mitogenica indotta da IGF-1: l'overespressione della PI-PLC β 1 induce un incremento della proliferazione in risposta allo stimolo, mentre l'overespressione della sua variante in cui manca la sequenza di localizzazione nucleare non ha effetti sulla proliferazione.⁽⁵⁰⁾ Un ulteriore lavoro ha mostrato che IGF-1 induce la fosforilazione della PI-PLC β 1 nucleare in un modo tempo-dipendente.⁽⁵⁴⁾ Per analizzare il possibile ruolo regolatore di IGF-1 sull'emopoiesi e determinare il suo meccanismo di azione, abbiamo studiato gli effetti di questo fattore di crescita sulla linea linfoide IL-3 dipendente, Ba/F3.

Come mostrato da lavori precedenti svolti sullo stesso modello *wild-type*, IGF-1 è in grado di prevenire la morte cellulare e la frammentazione del DNA; inoltre anche la proliferazione cellulare è stimolata da IGF-1.^(77, 78)

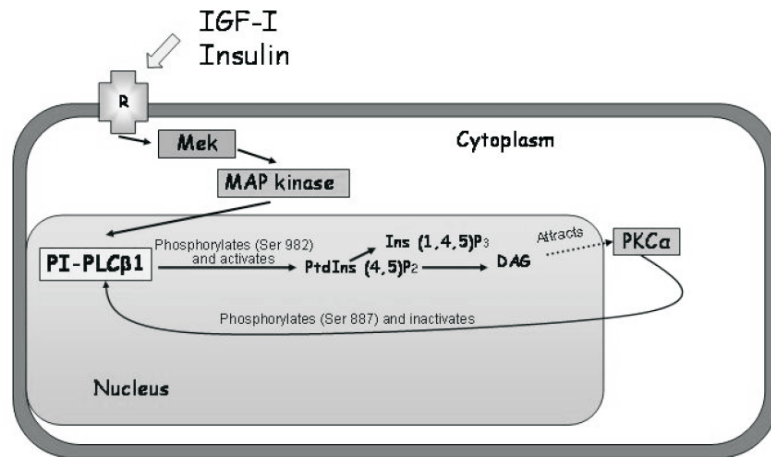


Figura 11. IGF-1 signaling nei fibroblasti murini Swiss 3T3

6. Modelli cellulari indagati

Ba/F3

Le Ba/F3 sono una linea cellulare immortalizzata derivante da midollo murino. Queste cellule appartengono al *lineage* linfoide e in particolare sono pro-linfociti B. *In vitro* non possono differenziare ulteriormente in quando viene a mancare il microambiente che consentirebbe loro di evolvere in linfociti B maturi. La loro crescita e proliferazione sono inoltre strettamente dipendenti dalla presenza di interleuchina-3 (IL-3) senza la quale vanno incontro a morte cellulare.⁽⁷⁹⁾ IL-3 è una citochina pleiotropica che stimola la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza di numerose cellule target all'interno del sistema emopoietico, e non solo. Si tratta di una citochina a catena corta (140 aminoacidi in topo, 133 aminoacidi nell'uomo), altamente glicosilata all' N-terminale e con una struttura a 4 α eliche *up-up-down-down*.

Dalla letteratura, abbiamo a disposizione alcune informazioni più dettagliate riguardanti il *signaling* delle fosfolipasi C in questo modello. Sappiamo che le cellule Ba/F3 sono state usate per lo studio del signaling mediato dal *fibroblast growth factor receptor 1* (FGF-R1) che, come dimostrato da Huang *et al*, coinvolge l'attivazione della fosfolipasi C-gamma e stimola l'idrolisi

del fosfatidilinositolo (PI). FGF stimola infatti la proliferazione cellulare mediante l'attivazione di Raf-1 e MAP chinasi.⁽⁸⁰⁾

Trasfettando le Ba/F3 e inducendo l'espressione della proteina ibrida formata dalla fosfoproteina nucleoplasmica nucleolare (NPM) e della chinasi anaplastica del linfoma (ALK) costitutivamente attive, Bai RY *et al* hanno dimostrato come *in vitro* il complesso interagisce specificamente con il dominio SH2 della fosfolipasi C-gamma. Anche *in vivo*, in cellule anaplastiche di linfoma, sembra che le due proteine si trovino associate nello stesso complesso, come dimostrato da esperimenti di co-immunoprecipitazione. La formazione di questo super complesso porta ad una specifica fosforilazione su Tyr664 che conduce all'attivazione della PLC-gamma, che può essere confermata dall'aumentata produzione di fosfoinositolo in queste cellule. Infine, PLC-gamma è un importante effettore *downstream* della NPM-ALK che contribuisce alla sua azione mitogenica e sembra essere fondamentale nella patogenesi dei linfomi anaplastici a grandi cellule.⁽⁸¹⁾ In cellule Ba/F3 overesprimenti il recettore per eritropoietina (EPO-R), Halupa A *et al* hanno evidenziato la necessità di una fosforilazione a livello del residuo Tyr479 del recettore per il suo riconoscimento e legame da parte della PLC-gamma1. Altri studi hanno identificato il residuo Tyr479 del recettore EPO come importante nell'attivazione della cascata MAP chinasi, in quanto necessario per il legame della PI3K.⁽⁸²⁾

Un ultimo recente lavoro ha mostrato come la fosfolipasi C $\beta 3$ sia un nuovo *tumor suppressor* implicato nell'insorgenza di neoplasie mieloplastiche, linfomi e altri tumori. La PLC $\beta 3$ può infatti formare complessi multimolecolari con il fattore di trascrizione Stat5 (la cui attivazione costitutiva in cellule ematopoietiche causa neoplasie) e con la fosfatasi SHP-1, in grado di regolare negativamente Stat5 una volta reclutato nel complesso grazie alla sua interazione con il dominio C-terminale della PLC $\beta 3$.⁽⁸³⁾

FELC

Le FELC sono cellule murine eritroleucemiche, costituite da progenitori di cellule eritroidi ottenute da milza di topo infettato con il Friend virus.⁽⁷⁹⁾ Queste cellule così trasformate sono arrestate allo stadio pro-eritroblastico del differenziamento e possono essere mantenute indefinitamente in coltura. Tuttavia, dopo trattamento con vari agenti chimici, le FELC possono essere indotte al differenziamento eritroide. Tra i più potenti induttori ricordiamo DMSO ed esametilene bisacetamide. Questa linea cellulare costituisce un valido modello per la comprensione del meccanismo alla base del differenziamento eritroide. Le informazioni disponibili in letteratura riguardanti lo studio del *signaling* mediato da PI-PLC $\beta 1$ in questo

modello cellulare sono riportati al paragrafo 4.5 “Ruolo della PI-PLC β 1 nel differenziamento eritroide *in vitro*”.

CEM

Le CEM sono una linea di cellule linfoblastiche (linfoblasti T) originariamente derivate, nel 1964, da sangue periferico di una bambina di 4 anni affetta da leucemia linfoblastica acuta.⁽⁷⁹⁾ Graber *at al* hanno monitorato il comportamento dell'enzima di membrana PI-fosfolipasi C, che modula segnali extracellulari, nelle fasi precoci e tardive nell'apoptosi nella linea cellulare CCRF-CEM, indotta con il dexametasone. L'attività della PLC aumenta notevolmente dopo 15 e 30 secondi dalla somministrazione del glucocorticoide, decresce dopo 2 minuti e cresce nuovamente dopo 5 minuti. Questi cambiamenti sono indicatori del fatto che l'enzima è maggiormente coinvolto nelle fasi precoci dell'apoptosi indotta con dexametasone in queste cellule linfoblastoidi.⁽⁸⁴⁾

JURKAT

Le Jurkat costituiscono una linea immortalizzata di linfociti T umani, isolati nel 1970 da sangue periferico di un ragazzo di 14 anni con leucemia linfoblastica acuta a cellule T.⁽⁷⁹⁾ Questo modello è usato principalmente per lo studio del *signaling* delle cellule T allo scopo di individuare bersagli molecolari per terapie farmaco-mediate. Lavori svolti su queste cellule-modello hanno individuato un nuovo recettore per la chinasi C attiva, RACK1, che inibisce selettivamente l'attività della fosfolipasi C-beta, dovuta al legame competitivo da parte di RACK1, PI3K gamma e PLC β alla proteina eterotrimerica G betagamma. Questo è un nuovo modello di regolazione della migrazione cellulare.⁽⁸⁵⁾

Kremer *at al* hanno recentemente dimostrato che l'attività della PLC in questo modello di linfociti è fondamentale per indurre la cascata di attivazione di ERK, processi di migrazione e processi di endocitosi nelle cellule T. In particolare, la PLC β 3 attiva il *pathway* Ras-ERK e aumenta la concentrazione intracellulare di Ca²⁺, la PLCgamma1 media processi di migrazione e chemiotassi. Gli autori suggeriscono infine che le PLC possono essere attivate a valle di recettori di chemochine che regolano la migrazione e altre funzioni di segnalazione.⁽⁸⁶⁾

THP1

Linea cellulare umana di leucemia acuta monocitica, derivata da sangue periferico di un bambino di 1 anno affetto da leucemia acuta monocitica.⁽⁷⁹⁾ E' prevalentemente usata per analisi immunocitochimiche e per l'analisi di interazioni proteina-proteina.

NB4

Le NB4 sono derivate da una giovane donna di 20 anni e costituiscono una linea leucemica di tipo promielocitico acuto.⁽⁷⁹⁾ Bertagnolo *et al* hanno investigato il ruolo della PLC β 2 durante il differenziamento granulocitico indotto con ATRA (*all-trans retinoic acid*) sulla linea promielocitica NB4 e in blasti primari di pazienti affetti da *acute promyelocitic leukemia* (APL). La somministrazione di ATRA induce in entrambe le cellule una forte up-regolazione dell'enzima, che dimostra come la PLC β 2 possa rappresentare un valido marcatore della maturazione mieloide e come possa predire la risposta ad ATRA nei pazienti APL.⁽⁸⁷⁾

HL60

Le HL60 sono una linea leucemica promielocitica, derivate da una donna di 36 anni.⁽⁷⁹⁾ Le HL60 sono dipendenti da transferrina e insulina per la loro crescita e sono inoltre in grado di differenziare in granulociti maturi se indotti da composti chimici come dimetil-solfossido o acido retinoico. Questa linea è prevalentemente usata per lo studio degli eventi molecolari alla base del differenziamento mieloide e per la comprensione dell'effetto di composti chimici o farmacologici su questi processi. Banfic *et al* hanno usato questo modello cellulare per valutare l'attività della PI-PLC nucleare durante le diverse fasi del ciclo cellulare. In particolare, sono stati evidenziati due picchi di massima attività, corrispondenti all'attivazione specifica della isoforma b della PLC β 1 in relazione a fosforilazioni su residui di serina. Questa attivazione è risultata essere indispensabile per la progressione attraverso le fasi G1/S del ciclo cellulare.⁽⁸⁸⁾

K562

Queste cellule sono una linea umana immortalizzata di leucemia mielogenica, derivate da una donna di 53 anni con CML in crisi blastica. Oltre al cromosoma Philadelphia, mostrano una seconda reciproca traslocazione tra in braccio lungo del cromosoma 15 e il 17.⁽⁷⁹⁾

7. Proteomica funzionale

La proteomica è definita come lo studio della globalità delle proteine nella loro complessità funzionale, contestualizzata nel sistema biologico sotto esame, al fine di studiare la fisiologia cellulare e individuare nuovi marcatori proteici per lo sviluppo di nuovi *targets* diagnostici e terapeutici.⁽⁸⁹⁾ Questa indagine considera quindi le modifiche, in termini quantitativi e qualitativi, che possono essere apportate al corredo proteico da fattori di trascrizione, *splicing* alternativo, modificazioni post-traduzionali e interazioni proteina-proteina o proteina-acidi nucleici.^(90, 91)

Gli attuali studi proteomici hanno due principali obiettivi e si concentrano in due principali macro-aree di indagine: la proteomica di espressione, dedicata alla definizione qualitativa e quantitativa dei livelli di espressione proteica dipendenti da particolari stimoli o condizioni fisio-patologiche; e la proteomica funzionale volta alla definizione di complessi multiproteici nel sistema biologico. Molte funzioni cellulari, infatti, non sono svolte da singole proteine, ma da complessi in cui le proteine interagiscono specificamente l'una con l'altra. Questi complessi proteici possono essere stabili, ma anche essere associazioni ligando-substrato di tipo transiente in cui si hanno effetti regolatori sulla funzione o sulla localizzazione in diversi compartimenti subcellulari. La comprensione globale delle funzionalità di una proteina dipende quindi dall'identificazione dei *partners* di legame con cui essa interagisce. L'associazione di una proteina con ligandi che appartengono ad un complesso multiproteico coinvolto in un determinato processo cellulare potrebbe essere infatti un forte indice della sua funzione biologica e della sua collocazione all'interno del *signaling* cellulare.⁽⁹²⁾

La *Yeast Two Hybrid* (YTH) è stata una delle metodiche maggiormente utilizzate per lo studio delle interazioni proteina-proteina. Questa tecnica utilizza il lievito come sistema eucariotico per verificare l'interazione tra due proteine, sfruttando la sua capacità di avere una fase aploide e una fase diploide. E' una tecnica molto utilizzata in proteomica, in quanto permette di individuare interazioni tra proteine, cascate di segnalazione e mutazioni che possono influenzare il legame tra diverse proteine.⁽⁹³⁾ Il meccanismo è semplice e sfrutta il fatto che i fattori di trascrizione sono costituiti da due subunità indipendenti tra loro, una di legame al DNA (*Binding Domain*) e l'altra che attiva la trascrizione (*Activation Domain*). Infatti la proteina di interesse detta "esca" viene espressa come proteina di fusione associata ad un dominio di legame al DNA, mentre un'altra proteina detta "preda" è invece espressa come proteina di fusione associata ad un dominio di attivazione trascrizionale. Se le due proteine interagiscono tra loro, sarà possibile verificare la trascrizione di un gene *reporter* posto sotto il controllo di una sequenza che risponde all'attivazione del *Binding Domain*. Solitamente il gene reporter è LacZ che codifica per la beta-

galattosidasi, in grado di idrolizzare l' X-gal in un composto blu: le colonie in cui avviene il *two Hybrid* saranno blu se nel terreno sarà presente X-gal. Da questo si può quindi dedurre un'interazione e un legame tra le due proteine.⁽⁹⁴⁾ (Figura 12)

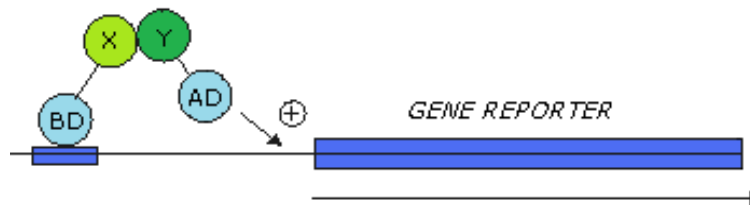


Figura 12. Funzionamento schematizzato della metodica Yeast two-hybrid

Il sistema del doppio ibrido venne inizialmente creato per identificare e valutare interazioni tra coppie di proteine, un'applicazione più recente è quella che si propone di valutare le interazioni tra proteine e acidi nucleici: *Three Hybrid System*. Una singola proteina, però, può anche essere parte di un complesso multiproteico, interagendo simultaneamente con più componenti del complesso. Per questo e per l'alta percentuale di falsi negativi o positivi, l'approccio della *Yeast Two Hybrid System* viene oggi affiancato dalla proteomica funzionale in cui è possibile isolare complessi di interazione proteica mediante purificazione per affinità (immunoprecipitazione), separarli mediante SDS-PAGE o cromatografia in fase liquida e identificarne i singoli componenti in spettrometria di massa.^(92, 95) (Figura 13)

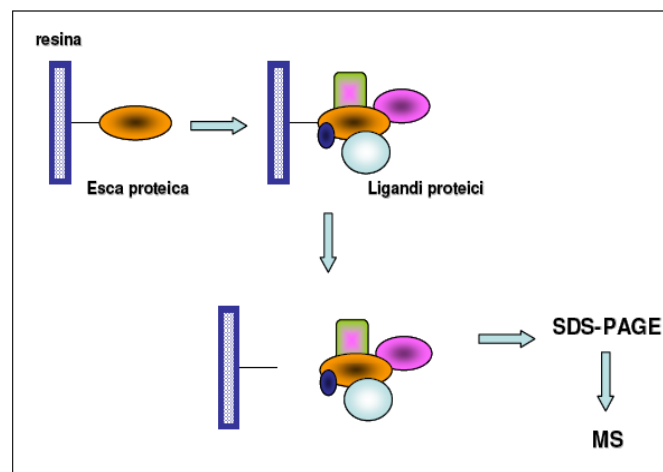


Figura 13. La tecnica di immunoprecipitazione per affinità è alla base della proteomica funzionale per l'identificazione mediante MS di proteine appartenenti a complessi funzionali

Sia la proteomica di espressione che la proteomica funzionale si basano essenzialmente su due passaggi analitici consecutivi. In primis, si procede con il frazionamento delle proteine totali o immunoprecipitate mediante elettroforesi mono e/o bidimensionale su gel di acrilamide, colorato con metodologie compatibili con l'analisi in spettrometria di massa (*Silver Staining* compatibile o Comassie Colloidale).⁽⁹⁶⁾ Successivamente, si procede con l'acquisizione dell'immagine mediante densitometria e con l'excisione delle bande/spot di interesse che saranno sottoposte e digestione triptica *over-night*. Il digerito triptico viene poi fissato su matrice solida o soggetto ad elettrospray e analizzato con uno spettrometro di massa (Maldi-TOF-TOF, ESI-Q-TOF), che genera lo spettro dei peptidi ottenuti dalla digestione. Con l'aiuto di software specifici viene confrontato il pattern di peptidi ottenuti con quelli presenti nelle banche dati (SwissProt, Tremble): il risultato è un elenco di proteine con assegnato un punteggio di probabilità.^(97,98,99)

8. Spettrometria di massa

La spettrometria di massa si avvale oggi di numerose moderne strumentazioni. In generale, gli spettrometri di massa si compongono di una sorgente, necessaria alla ionizzazione e volatilizzazione del campione in esame; un analizzatore che misura il rapporto massa/carica dell'analita e un rivelatore che determina il numero di ioni per ogni rapporto massa/carica trovato.^(99, 100) (Figura 14)

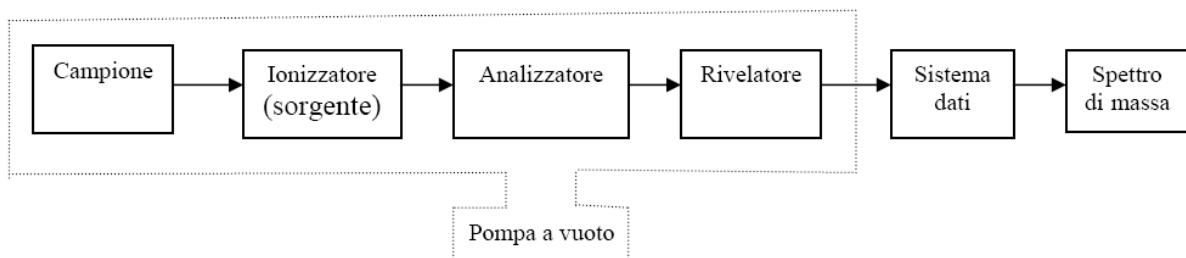


Figura 14. Rappresentazione schematica di uno spettrometro di massa

Nuove tecniche di ionizzazione hanno aperto la strada allo studio delle macromolecole biologiche mediante spettrometria di massa: *electrospray ionization* (ESI) e *matrix-assisted laser ionization* (MALDI). Entrambe le tecniche di ionizzazione sono accoppiate ai seguenti analizzatori: *time of flight* (TOF), *quadrupolo* (Q) o *ion trap* (IT). Le configurazioni più largamente utilizzate sono: MALDI-TOF-TOF; ESI Q-TOF; ESI-ion trap; OrbiTrap.^(99, 100)

La tecnologia sicuramente più all'avanguardia è la *Tandem Mass Spectrometry* (MS/MS) in cui si susseguono due spettrometri di massa in serie: gli ioni isolati da un primo analizzatore passano in una camera di collisione dove sono nuovamente frammentati. I frammenti prodotti sono selezionati da un secondo analizzatore, e danno informazioni in merito alla struttura primaria del peptide selezionato.⁽¹⁰¹⁾ (Figura 15) Le banche dati sono quindi interrogate con dati relativi non solo alle masse peptidiche, ma anche alla loro sequenza. E' stato dimostrato che anche un solo peptide è sufficiente per identificare una proteina in modo certo.⁽¹⁰²⁾

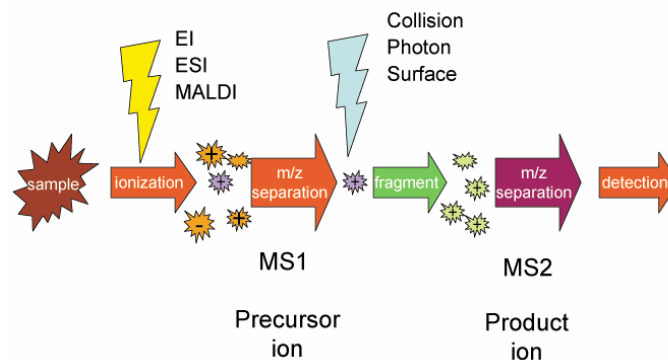


Figura 15. Rappresentazione schematica del flusso di lavoro effettuato in un'analisi MS/MS

L'accoppiamento di nano-cromatografia in fase liquida ad alto potere risolutivo (nano HPLC) in congiunzione diretta con uno spettrometro ESI-Q-TOF e tandem MS ha ulteriormente implementato l'utilizzo della spettrometria di massa per lo *screening* e per la caratterizzazione funzionale di miscele complesse, potendo analizzare quantità minime di campione dell'ordine delle femtomoli. Questa interfaccia con un HPLC capillare permette un'ampia gamma di applicazioni nel campo della proteomica e della peptidomica, ma anche della metabolomica e dell'analisi strutturale.⁽¹⁰³⁾

Nella tecnologia ESI, il campione è analizzato in fase liquida, disciolto in un solvente polare. All'interno della camera di ionizzazione il campione viene nebulizzato attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico: un flusso di gas inerte ad alta temperatura e a pressione inferiore a quella atmosferica favorisce l'evaporazione del solvente, che contiene l'analita carico. L'evaporazione del solvente porta ad una drastica diminuzione del volume: le forze repulsive tra molecole cariche prevalgono rispetto alle forze di tensione superficiale, determinando una nebulizzazione. Le gocce di spray si caricano quindi positivamente per azione del campo elettrico e vengono attratte da una lente di estrazione ioni, un capillare mantenuto sotto vuoto ad un potenziale negativo. Gli ioni carichi sono indirizzati e accelerati verso l'analizzatore, mediante

l'apposizione di una opportuna differenza di potenziale. Durante il processo di ionizzazione, le molecole proteiche e/o i peptidi vengono protonati da un numero variabile di protoni, in corrispondenza di residui basici o all'estremità N-terminale. Si forma una popolazione di residui a carica multipla $(M+nH)^{n+}$ che, separati da un analizzatore, danno luogo a distribuzioni di tipo gaussiano dei segnali m/z , ciascuna delle quali può essere trasformata su scala di massa reale da un algoritmo matematico.⁽¹⁰⁴⁾ Questo tipo di strumentazione è generalmente configurato con un analizzatore quadrupolare, costituito da quattro/sei/otto barre metalliche con geometria cilindrica, alle quali è applicato un campo elettrico oscillante a radio frequenze e che delimitano il percorso degli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione diretti al detector. Solo lo ione con un definito rapporto massa/carica (m/z) e a un dato valore della frequenza di oscillazione, percorre una traiettoria sinusoidale che gli consentirà l'uscita dal quadrupolo e l'ingresso nel sistema di rivelazione (fotomoltiplicatore). Gli altri ioni, a causa dell'oscillazione del quadrupolo assumono una traiettoria irregolare e impattano su una delle barre. Operando quindi una scansione di frequenza di oscillazione è possibile selezionare ioni a massa molecolare crescente.^(100,101) In successione al quadrupolo si trova l'analizzatore *Time-of-Flight* (TOF) in cui gli ioni subiscono un'accelerazione uniforme che consente di discriminare ioni che hanno stessa massa ma diversa carica in quanto la velocità che impiegano a percorrere l'analizzatore è diversa.^(103,104) Solitamente il collettore e l'analizzatore sono costituiti da un fotomoltiplicatore elettronico, formato da una serie di elettrodi consecutivi: quando lo ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che colpisce il secondo elettrodo che a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni, e così via. Il risultato è una potente amplificazione del segnale che viene infine elaborato dal software dello strumento per la generazione dello spettro di massa.^(103,104)

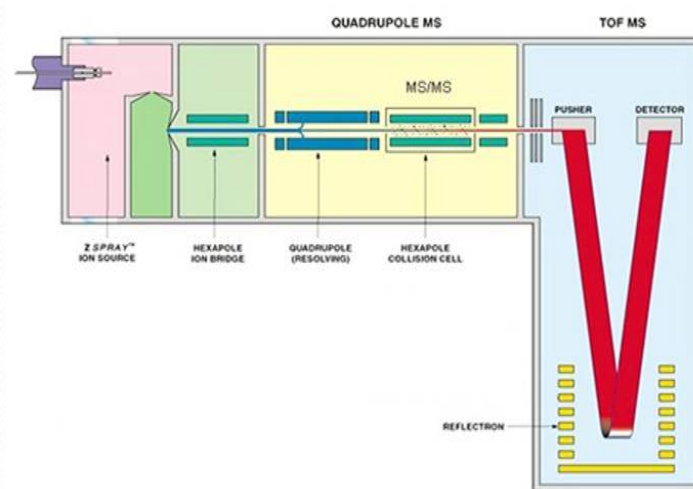


Figura 16. Rappresentazione schematica di uno spettrometro di massa ESI-Q-TOF

SCOPO DELLA RICERCA

La PI-PLC β 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 (PIP2) con produzione di diacilglicerolo (DAG) e di inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP3), che a loro volta agiscono come secondi messaggeri, andando ad attivare bersagli specifici coinvolti nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. Di particolare interesse è il ruolo della PI-PLC β 1 nel differenziamento ematopoietico; nelle cellule FELC si è visto ad esempio che la localizzazione nucleare della PI-PLC β 1 è fondamentale per il differenziamento in senso eritroide e che, in particolare, l'overespressione della PI-PLC β 1 nucleare induce una stimolazione della proliferazione rallentando il processo differenziativo. Tuttavia, non sono stati ancora del tutto identificati gli effettori molecolari attivati a valle della cascata di trasduzione indotta dalla PI-PLC β 1, né in particolar modo quelli specifici per l'isoforma 1b, predominante nel nucleo.

Lo scopo di questo lavoro è quello di identificare nuovi interattori e *partner* di legame della PI-PLC β 1b, siano essi conservati tra specie umana e murina oppure specie-specifici, per meglio comprendere il ruolo che questo enzima esercita a livello nucleare e i bersagli molecolari nucleari che attiva durante il differenziamento ematopoietico.

Per lo studio del modello murino, sono state utilizzate le linee cellulari FELC e Ba/F3, rispettivamente appartenenti al *lineage* di differenziamento eritroide e linfoide. Queste linee sono state manipolate geneticamente in modo da ottenere un'overespressione stabile e costitutiva della isoforma b della PLC β 1. Nel modello eritroide, come sopra accennato, la funzione della PLC β 1b è già stata ampiamente studiata, per cui ci si è concentrati sulla individuazione di partner di legami nucleari. Nel modello linfoide invece, il ruolo della PLC β 1b non è ben caratterizzato: è stata quindi effettuata un'analisi funzionale dell'overespressione della PLC β 1b, valutando in particolare eventuali effetti sulla proliferazione, sulla risposta al fattore di crescita IGF-1 e sulla risposta apoptotica.

Una volta ottenuti i modelli FELC e Ba/F3 stabilmente overesprimenti la PLC β 1b, è stata quindi effettuata l'analisi proteomica degli interattori nucleari della PLC β 1b mediante approccio funzionale in spettrometria di massa LC-nano-ESI-Q-TOF.

Nel modello umano, sono state utilizzate sei linee cellulari leucemiche corrispondenti a differenti *lineage* ematopoietici in cui si è valutata sia l'espressione proteica della PLC β 1 endogena, sia la distribuzione subcellulare nucleo/citoplasma. In particolare, le linee CEM e Jurkat appartengono al *lineage* linfoide, le NB4 e HL60 sono cellule di tipo mieloide che possono differenziare *in vitro*

in senso granulocitico, mentre le THP1 in senso monolitico. Le K562, arrestate allo stadio di pro-eritroblasti, che costituiscono il corrispettivo umano delle FELC. Lo scopo è quello di identificare nuovi *partner* di legame della PLC β 1, nell'uomo ancora ampiamente sconosciuti, e le modificazioni post-traduzionali (in particolare fosforilazioni) a cui l'enzima è soggetto nelle diverse fasi del differenziamento ematopoietico.

MATERIALI & METODI

1. Colture cellulari *in vitro*

Le cellule murine di eritroleucemia mieloide (FELC), le cellule umane di leucemia linfoblastica acuta T (CEM), le cellule umane di leucemia promielocitica acuta (HL60 e NB4), le cellule umane di leucemia acuta T (Jurkat), le cellule umane di leucemia mielogenica (K562) e le cellule umane di leucemia monocitica (THP1) sono state incubate a 37°C con 5% CO₂ in terreno RPMI 1640 (Sigma), con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino (FBS), 2mM L-glutamina e 1x streptomicina/penicillina, ad una densità cellulare ottimale di 5x10⁵ - 1x10⁶ cellule/ml. Le cellule murine linfoidi pro-B (Ba/F3) sono state cresciute a 37°C con 5% CO₂ in terreno Fischer's (Gibco), con l'aggiunta di 10% FBS, 5% *conditioned IL-3 media* da surnatante di cellule X63-AG8-653, 2mM L-Glutamina e 1x streptomicina/penicillina, ad una densità cellulare ottimale di 5x10⁵ cellule/ml. Le cellule Phoenix sono state coltivate in terreno DMEM *High-Glucose* (Sigma) con l'aggiunta di 10% FBS, 2mM L-glutamina e 1x streptomicina/penicillina.

2. Reagenti e Anticorpi

Anticorpi PRIMARI			
	Origine	Diluizione e tempo di incubazione	Ditta produttrice
PLCβ1 (R233)	rabbit	1:500 +1% milk, o/n	Santa Cruz
PLCβ1	mouse	IP: 2 ugr/mg di lisato, o/n	Upstate Biotechnology
IgG aspecific	mouse	IP: 2ugr/mgr di lisato, o/n	Santa Cruz
Lamin B	goat	1: 1000, 2h	Santa Cruz
β-tubulin	mouse	1:8000, 1h	Santa Cruz
PARP	rabbit	1:500, 2h	Santa Cruz
P53	rabbit	1:500, o/n	Santa Cruz
Caspasi 3	rabbit	1:300, o/n	Santa Cruz

Anticorpi SECONDARI			
IgG anti-rabbit-HRP	donkey	1:10000, 1h	Santa Cruz
IgG anti-mouse-HRP	goat	1:10000, 1h	Santa Cruz
IgG anti-goat-HRP	donkey	1:10000, 1h	Santa Cruz

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.

3. Clonaggio PLC β 1b

3.1 DIGESTIONE ENZIMATICA

L'inserto di nostro interesse (PI-PLC β 1b) si trovava inserito nel vettore pMSCVneo, per cui è stata necessaria una digestione enzimatica con EcoRI (Promega 5000u, conc 12u/ μ l R6011) per la sua escissione. La reazione di digestione enzimatica è stata allestita in ghiaccio aggiungendo ad una provetta eppendorf 1 μ l di enzima di restrizione, 1 μ l di tampone di reazione 10x (per una concentrazione finale di 1x), e 3 μ gr di DNA plasmidico pMSCVneo/PLC β 1b ed acqua *DNase-free* e *RNase-free*, per un volume totale di 100 μ l. La miscela è incubata a 37°C per 2 ore, in modo che l'enzima di restrizione potesse agire. In seguito, l'enzima è stato inattivato portando la reazione a 65°C per 10 minuti, e i prodotti di digestione sono analizzati mediante un gel di agarosio allo 0,8% in tampone TAE 1x.

3.2 LIGAZIONE DEL FRAMMENTO PLC β 1b NEL VETTORE RETROVIRALE pBB

Il vettore pBB privo dell'inserto è stato preventivamente sottoposto ad una reazione di defosforilazione mediante incubazione per 30 minuti a 37°C con 4U di fosfatasi alcalina (CIP). Il vettore vuoto e quello contenente l'inserto sono digeriti enzimaticamente e separati mediante

elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% a 100V. Le bande di interesse sono state tagliate e il DNA purificato seguendo la procedura del *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). La reazione di ligazione è stata preparata con 200 ngr di vettore pBB, 600 ngr di inserto PLCβ1b, 1μl di buffer di ligazione e 20 U/μl di enzima ligasi (Promega) in un Volume finale di 10 μl. La miscela così composta è stata incubata a 42°C per 3h.

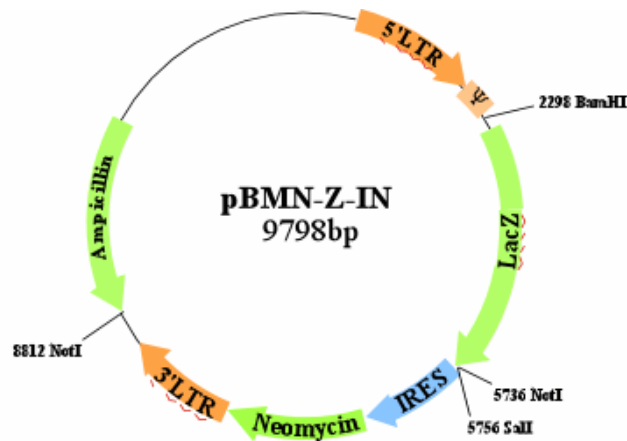


Figura 17. Vettore virale. Quello da noi utilizzato è privo della regione lacZ ed ha una lunghezza complessiva di 6548 bp

3.3 TRASFORMAZIONE BATTERICA PER SHOCK TERMICO

I batteri DH5-α sono stati trasformati con 100 ngr di DNA del vettore pBB-PLCβ1b, seguendo il protocollo di trasformazione per shock termico che prevede un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, poi un'incubazione di 45 secondi a 42°C e infine un'incubazione di 2 minuti in ghiaccio. I batteri sono stati poi piastrati su petri di LB-medium contenenti l'antibiotico ampicillina ad una concentrazione finale di 100 μgr/ml. Il plasmide è stato digerito con BamHI (20U, 2h, 37°C) per controllare l'orientamento dell'inserto nel vettore nelle diverse colonie. Per l'estrazione e la purificazione del clone virale dalla coltura batterica è stato utilizzato il kit commerciale *Qiagen Plasmid MaxiPrep* (Qiagen), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Il DNA purificato è stato infine quantificato mediante lettura al NanoDrop 1000 della ditta Thermo Scientific.

4. Infezione delle linee FELC e Ba/F3 con il vettore retrovirale pBB-PLCβ1b

Le *packaging cells* Phoenix sono state piastrate ad una concentrazione di 1-1,5 x 10⁶ cellule totali e trasfettate transientemente con il vettore pBB-PLCβ1b mediante l'utilizzo di liposomi

(*TransIT®-LT1 Transfection Reagent*, Mirus) e seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Dopo 24h si è prelevato il surnatante contenente il virus completo (titolo virale intorno a 1×10^7 virus/ml) e mediante spinoculazione si sono infettate le cellule bersaglio FELC e Ba/F3: 2×10^5 cellule bersaglio sono state centrifugate con il surnatante virale per 30 minuti a 32°C . $8 \mu\text{gr/ml}$ di polibrene sono stati aggiunti alla soluzione di cellule/virus per favorire la penetrazione del virus all'interno della cellula durante la centrifugazione. Le cellule così infettate sono state risospese in 10 ml di terreno di crescita e incubate per 48 ore a 37°C , $5\% \text{CO}_2$, quindi le cellule sono state selezionate con Blastidina (Sigma) ad una concentrazione finale di $10 \mu\text{gr/ml}$.

5. Estrazione di RNA e RT-PCR

L'RNA totale è stato isolato dalle linee cellulari usando il kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen Ltd, Valencia, CA, USA) seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Le tracce di DNA genomico sono state eliminate trattando i campioni con DNAsi I (Qiagen Ltd).

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da $2 \mu\text{gr}$ di RNA totale usando 200 U di M-MLV retrotrascrittasi, $0.5 \mu\text{g}$ di Primers oligodT, 25U di inibitore delle ribonucleasi, ogni dNTP alla concentrazione di 10 mM per 1h a 42°C , in un V finale di 25 ul.

6. PCR e amplificazione delle PLC β 1a e PLC β 1b endogene

Il cDNA ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato come stampo nella reazione di PCR allo scopo di amplificare in modo specifico le due isoforme endogene della PLC β 1a e PLC β 1b nelle diverse linee. La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando le seguenti coppie di oligonucleotidi:

Mouse

PLCB 1A : → FW: 5' ACG GAG CTG GAG CAA GAA TA 3'

→ RV: 3' TCA CCT TTG CAG CAT CTG AG 5'

PLCB 1B: → FW: 5' AGA AGC CCA AGG GGG AAG 3'

→ RV: 3' CTT GAG AGC TTG AGG GTT GG 5'

La reazione è stata allestita in un volume finale di 50 μ l utilizzando la Taq DNA polimerasi PCR Master mix (Promega), secondo il seguente protocollo di amplificazione; 1 ciclo a 95 °C per 3 minuti; 30 cicli: 95°C per 30 secondi, 60°C per 1 minuto, 72°C per 30 secondi; 1 ciclo a 72°C per 5 minuti.

7. Saggio MTT

Le cellule Baf3-pBB e Baf3-PLC β 1b sono state seminate in triplicato su piastre da 96 pozzetti *flat* (Nunc, Rochester, NY), alla concentrazione di 1×10^4 cellule in un V finale di 100 μ l per pozzetto. Le cellule sono state coltivate per diversi tempi (30', 4h, 24h, 48h, 72h, 96h) a concentrazioni decrescenti di IL3 (10 ngr/ml; 1ngr/ml; 0,1ngr/ml; 0,01 ngr/ml) e a concentrazioni crescenti di IGF-1 (20 ngr/ml; 50 ngr/ml; 100 ngr/ml; 200 ngr/ml; 350 ngr/ml; 500 ngr/ml). Alla fine dei trattamenti sono stati aggiunti in ogni pozzetto 10 μ l del reagente 1 del kit MTT (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germania) e la piastra è stata incubata per 4 ore in atmosfera umidificata a 37°C. I cristalli di formazano sono stati solubilizzati con l'aggiunta di 100 μ l di soluzione di solubilizzazione (reagente 2 del kit MTT) dopo un'incubazione per tutta la notte a 37°C. L'attività metabolica è stata valutata mediante valutazione al lettore per micropiastre Infinite 200 PRO series (Tecan Group Ltd) ad una lunghezza d'onda di 570 nm. Per ciascun esperimento, ogni campione è stato seminato in triplo per l'elaborazione statistica dei dati. La percentuale delle cellule vitali è stata calcolata mediante il rapporto tra la media dell'assorbanza delle cellule trattate e la media dell'assorbanza delle cellule di controllo.

8. Saggio Clonogenico

Le cellule Ba/F3-pBB e le Ba/F3-PLC β 1b sono state risospese ad una concentrazione di 1×10^4 in terreno Fischers's con diverse concentrazioni di IL3 (1ngr/ml; 0,1ngr/ml; 0,01 ngr/ml). Le cellule sono state piastrate in multiwells da 6 pozzetti di metilcellulosa (MethoCult GF+ H4535, Stem Cell technologies) e lasciate crescere per 96 h all'interno di un incubatore in atmosfera umidificata (5% CO₂, 37°C). Le colonie (definite tali solo se il numero complessivo di cellule supera le 50 unità) e i *clusters* (aggregati con meno di 50 cellule) sono stati infine osservati e contati al microscopio ottico invertito e valutati morfologicamente secondo il metodo descritto da Nissen-Druey (Nissen-Druey et al., 2005). L'analisi statistica è stata effettuata usando il software GraphPad Prism.

9. Analisi Citofluorimetrica a Flusso (FACS)

1 x 10⁶ cellule totali sono state centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti a 4°C, lavate una volta con PBS1x e fissate infine *over-night* a 4°C in una soluzione composta da 0,5 ml PBS1x e 4,5 ml di etanolo v/v 70% freddo. Le cellule sono state poi centrifugate e risospese in 1ml di PBS1x contenente 100 µgr/ml RNAasi A e 5 µgr/ml di Propidio Ioduro (PI). Dopo un'incubazione al buio a 4°C per almeno due ore, la sospensione cellulare è stata analizzata al Citofluorimetro a Flusso FACStar Plus (Beckton Dickinson).

10. Purificazione nuclei da cellule Ba/F3, FELC, CEM, Jurkat, HL60, NB4, THP1, K562

Le cellule sono state contate mediante camera di Burkner ed è stato raccolto un pellet pari a 1x10⁷ cellule totali, centrifugando a 1600 rpm per 5 minuti a 4°C. Il pellet è stato lavato una volta con 8 ml di tampone fosfato (PBS 1x), pH 7,4. Successivamente le cellule sono state risospese in 500 µl di tampone per l'isolamento nucleare (TM5: 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 5mM MgCl₂; 10mM NaCl; 1mM NaVO₄; 10µg/ml inibitori delle fosfatasi; 10µg/ml inibitori delle proteasi; 15µg/ml inibitori delle calpaine I e II) e mantenute per 20 minuti in ghiaccio. Nel passaggio seguente, si è aggiunto lo 0,3% di Triton-X100 e la sospensione, dopo un'agitazione di circa 30 secondi, è stata fatta passare una/due volte in siringa con ago 23G. I nuclei così ottenuti sono stati centrifugati a 800 x g per 8 minuti a 4° C e lavati una volta con 500 µL di tampone di purificazione (TM5). Quando necessario, è stata conservata la frazione citoplasmatica, procedendo subito con un dosaggio proteico e con l'aggiunta di *sample buffer* per impedire degradazione proteica. La purezza dei nuclei e la loro pulizia da residui citoplasmatici sono state verificate immediatamente mediante osservazione al microscopio in campo chiaro (ingrandimento 20X) e in un secondo momento tramite immunoblotting con anticorpo anti-β-tubulina.

11. Preparazione del lisato proteico totale / nucleare

I pellet cellulari/nucleari sono stati solubilizzati in RIPA BUFFER (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1% NP-40; 100 mM NaCl; 0.1% SDS; 0.5 % sodio deossicolato; 50 mM NaF; 1mM EDTA; 2mM Na vanadato; 1mM β-glicerofosfato; 10µg/ml inibitori delle fosfatasi; 10µg/ml inibitori delle proteasi; 15µg/ml inibitori delle calpaine I e II; 10µg/ml benzonasi) e la lisi è stata fatta procedere in ghiaccio per 30 minuti, vortexando ogni 10 minuti. Per rimuovere il materiale insolubile e gli acidi nucleici, i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 20 minuti a 4°C ed è stato recuperato

il surnatante. La concentrazione proteica dei diversi preparati è stata determinata attraverso letture allo spettrofotometro utilizzando il "Bradford protein assay" (Bio-Rad): 1µl di ogni campione, preparato in triplicato, viene diluito in 800 µl di acqua distillata, mentre il campione di riferimento (bianco) prevede 1µl di RIPA; ad ogni provetta sono aggiunti 200µl di colorante Bradford che reagisce con le proteine dando una colorazione blu. La lettura dell'assorbanza a 595 nm è stata misurata allo spettrofotometro e la concentrazione proteica è stata determinata interpolando i valori ottenuti con quelli di una curva standard di BSA.

12. SDS-PAGE e analisi mediante immunoblotting

50-100 µgr di ogni campione sono stati diluiti con 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 6% per l'immunoblotting anti-PLCβ1. Le proteine così separate sono state trasferite da gel a membrana di nitrocellulosa, applicando un voltaggio di 80 V per 3h a 4°C. L'avvenuto trasferimento delle proteine è stato verificato con colorazione reversibile con Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich). La membrana di nitrocellulosa è stata poi saturata con 5% di latte scremato in polvere (Karnak) in PBS (Phosphate Buffered Saline) + 0.1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich), per 2 ore a temperatura ambiente. L'incubazione con l'anticorpo primario è stata effettuata seguendo le diluizioni e i tempi indicati nella tabella al paragrafo 2 "Reagenti e Anticorpi". 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 della proteina di interesse è stata rivelata con il *SuperSignalWest Pico chemiluminescent reagent* (Pierce) in cui la perossidasi, in presenza del suo substrato, induce una reazione di chemiluminescenza. Le proteine sono impressionate su lastre fotografiche (Kodak) racchiuse in una cassetta radiologica (Amersham Biosciences UK Limited, Bucks, UK) e sviluppate in camera oscura oppure acquisite mediante il Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Biorad).

13. Immunoprecipitazione

2 mgr di lisati nucleari, ottenuti come precedentemente descritto e portati ad un volume finale di 1ml, sono stati pre-incubati per 1.5h con 2 µgr/mgr lisato di IgG aspecifiche anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) e con 20 µl di proteina A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology) per

ulteriori 30 minuti a 4°C, allo scopo di eliminare i legami aspecifici (*preclearing*). La sospensione è stata centrifugata a massima velocità e il surnatante è stato incubato con l'anticorpo primario, o con le IgG aspecifiche nel caso del controllo, e lasciato in agitazione o/n a 4°C. Per recuperare gli immunocomplessi, sono stati aggiunti ai campioni 20 µL di proteina A/G agarosio e posti nuovamente in agitazione per 2h a 4°C. I campioni sono stati centrifugati per 2 minuti a 10000rpm e il pellet contenente i complessi è stato lavato 2 volte in tampone di lavaggio: 25 mM Tris/saccarosio e 1% NP40. Per distaccare gli immunocomplessi dalla proteina A/G è stato aggiunto Laemli sample buffer 4x; i campioni sono quindi stati denaturati per 5 minuti a 100°C e infine caricati su gel di poliacrilamide *pre-casted* gradientato 4-15% (Biorad). 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, quindi decolorato con una soluzione di 25% (v/v) metanolo; tutte le *lanes* del gel sono state tagliate in bande di circa 0.5 cm e sottoposte ad analisi in spettrometria di massa.

14. Spettrometria di massa LC-MS/MS

Le bande relative alle proteine d'interesse sono state rimosse manualmente da gel, colorato con *Blu Coomassie* G-250 colloidale. Le proteine sono state quindi lavate con 100mM ammonio bicarbonato (pH 8) e 50% ACN (Acetonitrile) 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 con tre lavaggi consecutivi utilizzando una soluzione 50% ACN e 0,1% TFA. In ciascuna estrazione i campioni sono stati posti in agitazione per 5 minuti, seguita da centrifugazione e rimozione del surnatante. Il surnatante di partenza e quello ottenuto dalle diverse estrazioni sono stati riuniti e asciugati fino ad ottenere un volume di circa 20 µL. 1 µL di questa soluzione, corrispondente a 1pmol, è stato iniettato in uno spettrometro di massa nano-ESI-Q-TOF G6520 (Agilent Technologies Inc.) equipaggiato con cromatografia capillare in fase liquida (CapLC system 1200, Agilent Technologies Inc.) e con sistema Chip Cube (Agilent Technologies Inc.). Il Chip utilizzato è costituito da una colonna di arricchimento Zorbax 300SB-C18 (4mm x 40 nL, 5 µm) e da una colonna analitica Zorbax 300SB-C18 (75mm x 43 mm, 5µm). I peptidi, iniettati tramite il sistema cromatografico capillare, si legano prima alla colonna di arricchimento poi, sono lavati per rimuovere i contaminanti. La separazione analitica avviene quando la valvola viene fatta passare dalla CapLC alla nanoLC e i

peptidi vengono fatti eluire dalla colonna analitica con un flusso di 400 nl/min di buffer A (0.1% acido formico, 3% ACN), utilizzando un gradiente di eluizione che prevede il passaggio da 4% a 30% di buffer B (0.1 % acido formico in 97% ACN) in 17 min, dal 30% al 40% di buffer B in 3 min, dal 40% al 85% di buffer B in 3min, poi 85% di buffer B costante per 2 min. 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 250 a 2450 m/z ; in seguito, i 3 picchi multi-carica (2+, 3+, 4+) che presentano intensità maggiore, utilizzando una soglia minima di 200 unità di assorbanza, 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 50 a 3200 m/z . Ciascun peptide è stato selezionato due volte, poi dinamicamente escluso per 0.1 min. 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 *open source* X!Tandem all'interno della Trans Proteomic Pipeline (TPP v.4.4 r1) associato al database UniProtKB (Release 2011_11, 18.748.263 entries), per ottenere la sequenza peptidica. Si è considerata una tolleranza di 20 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 tagliato dalla tripsina, e le modificazioni post-traduzionali considerate sono state la carbamidometilazione delle cisteine, dovuta alla iodoacetamide (modificazione fissa) e l'ossidazione delle metionine (modificazione variabile).

RISULTATI

1) Ottenimento dei modelli sperimentali murini

Il gene della PLC β 1b è stato exciso dal vettore virale MSCV e clonato nel vettore retrovirale pBB. I batteri competenti DH5 α sono stati trasformati per shock termico e selezionati con ampicillina. (Figura 18) L'orientamento dell'inserto è stato verificato mediante digestione enzimatica con BamHI. Le due bande di 2478 bp e 6548 bp indicano che la PLC β 1b si è inserita correttamente nel plasmide.

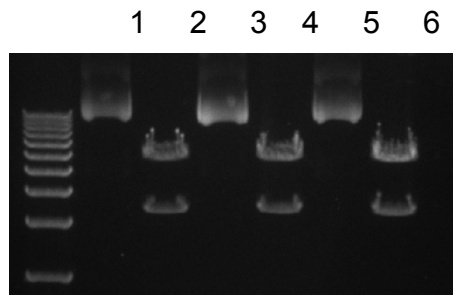


Figura 18. Digestione enzimatica con BamHI di tre colonie batteriche trasformate con il vettore pBB-PLC β 1b. Le lanes 1, 3, 5 mostrano il DNA non digerito, mentre le lanes 2, 4, 6 mostrano il DNA digerito con BamHI

I vettori retrovirali possiedono la capacità di integrarsi nel genoma di cellule in replicazione e vengono sfruttati per ottenere l'overespressione stabile delle proteine di interesse. Per motivi di sicurezza i vettori retrovirali utilizzati in laboratorio sono ingegnerizzati in modo da essere privi del pool di geni che li renderebbe infettivi. Per produrre un retrovirus completo è necessario inserire il vettore virale in una linea cellulare cosiddetta *packaging*, in cui sono stati trasfettati i geni che codificano per le proteine del virione (capside e trascrittasi inversa), in modo che il virus possa diventare infettivo e penetrare nella cellula bersaglio.

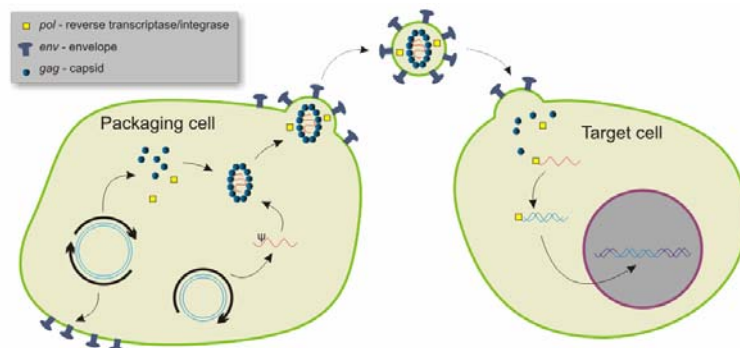


Figura 19. Meccanismo di replicazione dei retrovirus nelle procedure di laboratorio

Le cellule FELC e Ba/F3 sono state quindi infettate in modo da ottenere un'overespressione stabile e costitutiva della isoforma "b" della PLC β 1. L'efficienza di infezione e i livelli di overespressione sono stati verificati mediante immunoblotting. (Figura 20, lanes 2 e 4)

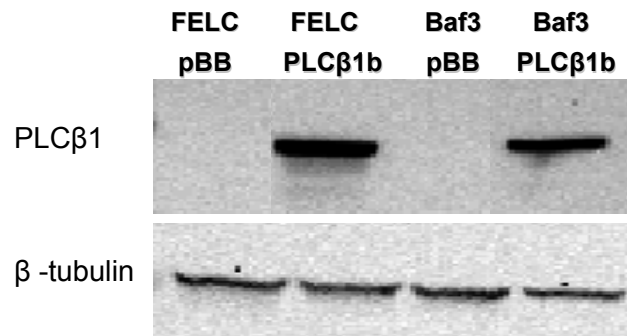


Figura 20. Valutazione dell'overespressione della PLC β 1b. Lanes 1 e 3: Ba/F3 e FELC infettate con il vettore vuoto pBB. Lanes 2 e 4: Ba/F3 e FELC infettate con il vettore pBB-PLC β 1b

Il livello d'espressione basale della PLC β 1 endogena nelle linee FELC e Ba/F3 è difficilmente rilevabile in immunoblotting. E' stata quindi verificata la presenza del trascritto genico mediante una reazione di amplificazione con PCR da cDNA, disegnando primers specifici per discriminare le due isoforme. Come si osserva in Figura 21, nelle lanes 1 e 2 sono rispettivamente presenti i prodotti di amplificazione della isoforma '1a' nelle FELC-pBB e Ba/F3-pBB, mentre nelle lanes 3 e 4 si trovano i prodotti di amplificazione della isoforma '1b'. A parità di cicli di amplificazione, in entrambe le linee sono presenti i trascritti delle due isoforme di PLC β 1, sebbene il trascritto della PLC β 1a sia maggiormente rilevabile.

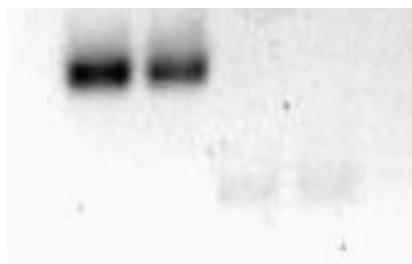


Figura 21. Valutazione dell'espressione degli mRNA corrispondenti alla due isoforme della PLC β 1. Nella lanes 1 e 2 si trovano i prodotti di amplificazione specifici per l'isoforma 1a, nella lanes 3 e 4 quelli specifici per l'isoforma 1b

E' stata poi valutata la stabilità dell'overespressione, coltivando le cellule per tre settimane con e senza selezione (10 μ gr/ml blasticidina). Come si osserva in Figura 22, l'overespressione della PLC β 1b nelle due linee Ba/F3 (A) e FELC (B) si mantiene costante nel tempo e non diminuisce se confrontata con le stesse cellule mantenute in selezione.

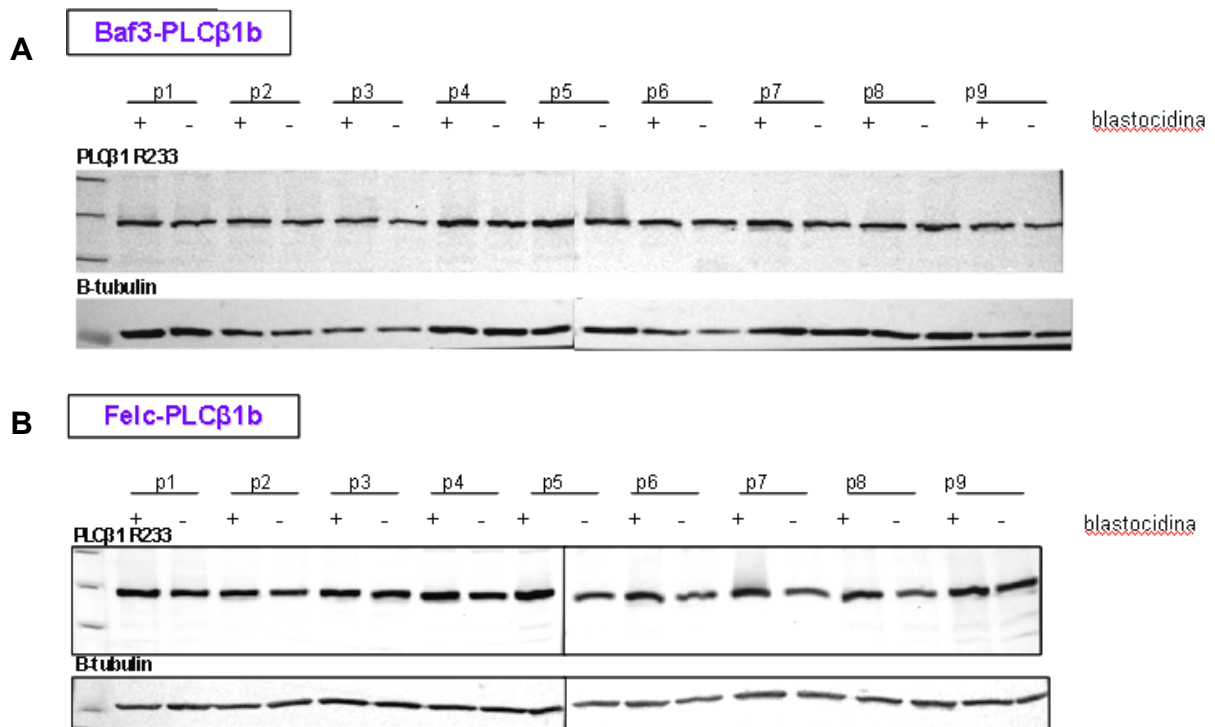


Figura 22. Valutazione della stabilità dell'overespressione della PLC β 1b nelle cellule Ba/F3-PLC β 1b (A) e FELC-PLC β 1b (B)

2) Distribuzione subcellulare della PLC β 1b overespressa nei modelli murini

50 μ gr di frazioni nucleari e citoplasmatiche ottenute con i protocolli illustrati in materiali e metodi, sono stati caricati su un gel di acrilamide al 6% e le proteine trasferite su membrana di nitrocellulosa. Mediante immunoblot si è valutata la distribuzione subcellulare della PLC β 1b. Come si osserva nel pannello superiore della Figura 23, la proteina è presente a livello nucleare non solo nelle FELC come già noto ⁽⁵⁶⁾, ma anche nelle Ba/F3, evidenza finora non riportata in letteratura e che suggerisce un potenziale ruolo di questa proteina a livello nucleare, nel *lineage* linfoide. La purezza della preparazione nucleare è stata confermata mediante immunoblot con anti- β tubulina e anti-lamina B.

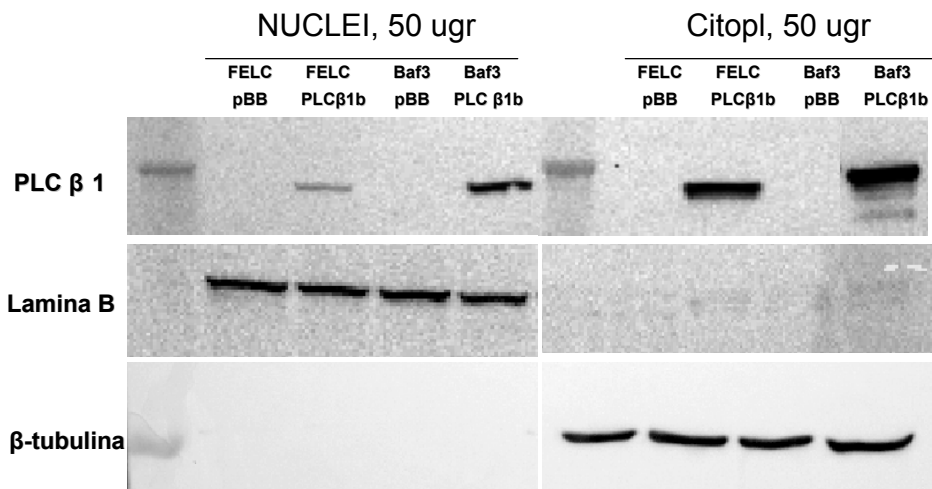


Figura 23. Valutazione della distribuzione subcellulare della PLCβ1b overespressa nelle linee FELC-PLCβ1b e Ba/F3-PLCβ1b

3) Distribuzione subcellulare della PLCβ1 endogena in linee leucemiche umane

E' stato effettuato anche uno screening sui livelli d'espressione e distribuzione subcellulare della PLCβ1 su modelli leucemici umani per valutare la presenza di differenze specie-specifiche e legate al diverso stadio di differenziamento emopoietico. Sono state analizzate le linee cellulari leucemiche CEM, Jurkat, THP1, NB4, HL60 e K562 che si possono schematicamente collocare secondo la rappresentazione in Figura 24: CEM e Jurkat sono cellule di tipo linfoide (linfociti T), NB4 e HL60 sono di tipo mieloide e possono differenziare in senso granulocitico, le THP1 sono di tipo monocitico e le K562 sono pre-eritroblasti.

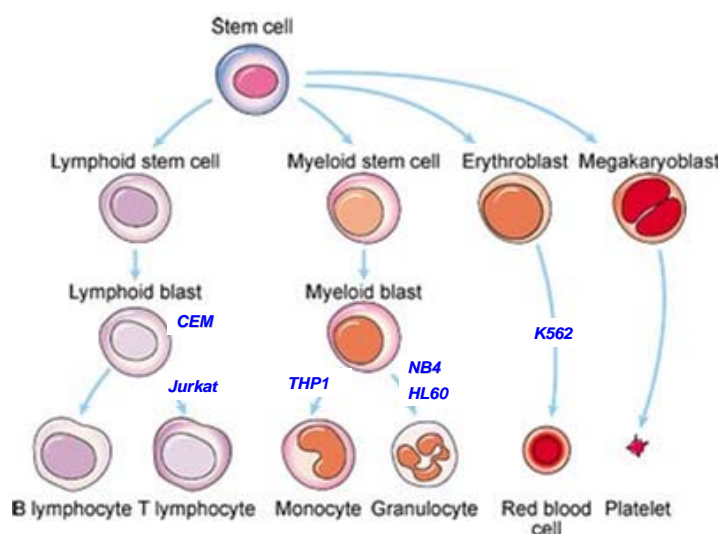


Figura 24. Stadio differenziativo delle cellule leucemiche umane CEM, Jurkat, THP1, NB4, HL60 e K562

Poiché queste cellule hanno un tempo di duplicazione differente le una dalle altre, che può variare dalle 24 ore alle 48 ore, si è verificato mediante citofluorimetria a flusso che le cellule prelevate ai fini dell'esperimento avessero una distribuzione comparabile nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Si sono dunque raccolte 1×10^6 cellule totali, fissate e incubate con propidio ioduro per analisi al citometro a flusso.

Come si può osservare in Figura 25, le sei linee cellulari mostrano una percentuale comparabile di cellule in fase G1, G2 e S del ciclo cellulare.

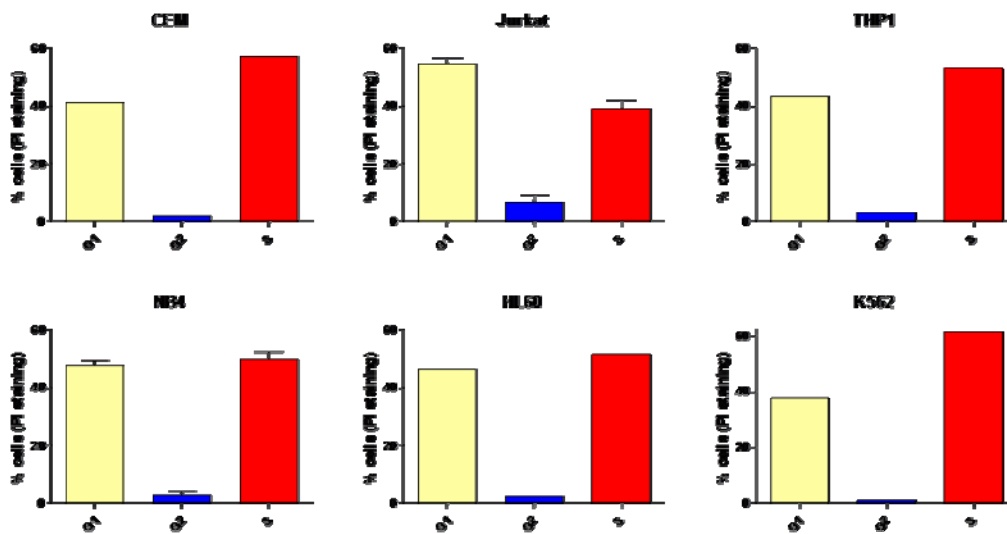


Figura 25. Distribuzione delle sottopopolazioni nelle diverse fasi del ciclo cellulare mediante analisi in citofluorimetria a flusso

90 μ g di lisati cellulari sono stati separati su SDS-PAGE 6% e le proteine trasferite su membrana di nitrocellulosa. (Figura 26) L'analisi in immunoblotting con anticorpo policlonale anti-PLC β 1 ha rilevato in tutte le linee, ad eccezione delle HL60, l'espressione della proteina endogena. In particolar modo l'espressione basale è risultata essere abbondante nella linea di linfociti T Jurkat, mentre un livello di espressione inferiore è stato rilevato nelle THP1. Infine, le CEM, le NB4 e le K562 mostrano un livello di espressione comparabile in termini quantitativi. GAPDH è stato usato come normalizzatore di carica.

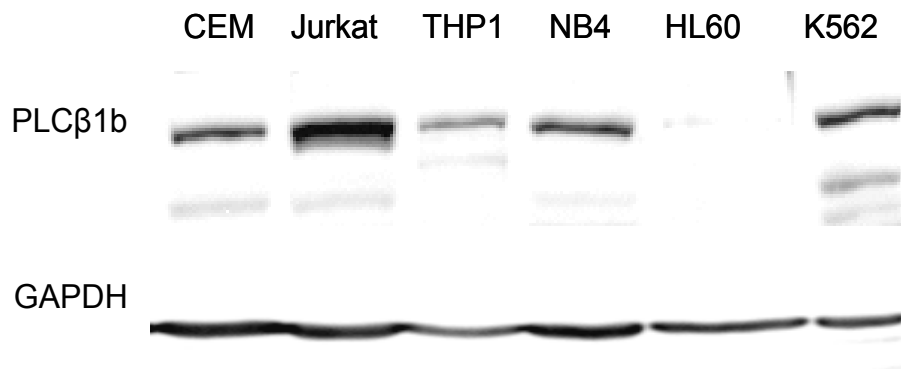


Figura 26. Valutazione dell'overespressione della PLCβ1 endogena nelle linee leucemiche umane CEM, Jurkat, THP1, NB4, HL60, K562

Il frazionamento nucleo-citoplasma ha evidenziato una diversa distribuzione subcellulare della PLCβ1 endogena nelle diverse linee cellulari. La stessa quantità di lisato nucleare e citoplasmatico (80µg) è stata separata su SDS-PAGE 6%. Come si osserva in Figura 27, ad eccezione delle HL60, la PLCβ1 è maggiormente presente a livello nucleare, rispetto alla frazione citoplasmatica. L'anticorpo utilizzato non discrimina tra le due isoforme, ma si può evincere in base al peso molecolare, che entrambe le isoforme sono presenti nel nucleo, sebbene la PLCβ1a (banda a peso molecolare superiore del doppietto) risulti maggiormente espressa. La purezza della preparazione nucleare è stata confermata con anti-β tubulina e anti-lamina B.

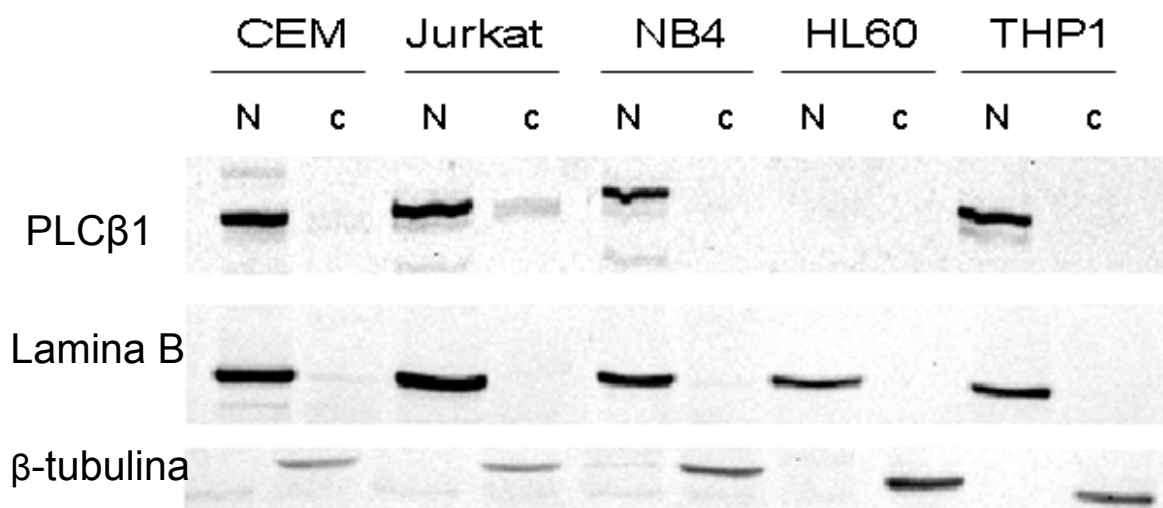


Figura 27. Valutazione della distribuzione subcellulare della PLCβ1 endogena nelle linee CEM, Jurkat, NB4, HL60 e THP1

4) CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE della linea Ba/F3-PLC β 1b

4.1. Proliferazione cellulare

L'effetto dell'overespressione della PLC β 1b sulla proliferazione cellulare è stato valutato con il saggio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), deprivando la linea cellulare Ba/F3 di IL3. La linea di pro-linfociti B Ba/F3 è infatti strettamente dipendente dalla citochina IL3 per la sua crescita e proliferazione e in assenza di questo fattore va rapidamente incontro a morte cellulare programmata.

L'MTT è un saggio colorimetrico standard che permette di valutare l'attività metabolica delle cellule e si basa sulla degradazione del sale di tetrazolio (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristalli di formazano da parte delle cellule metabolicamente attive, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. La reazione avviene ad opera dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, che è attivo soltanto nelle cellule vive ed agisce tagliando l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) convertendolo in formazano (un sale di colore blu). (Figura 28) La quantità di formazano prodotta viene misurata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 570 nm ed è proporzionale al numero di cellule vive. I dati così ottenuti vengono normalizzati rispetto al controllo ed utilizzati per costruire le curve dose-risposta.

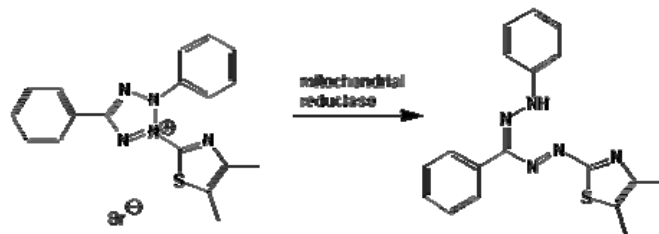
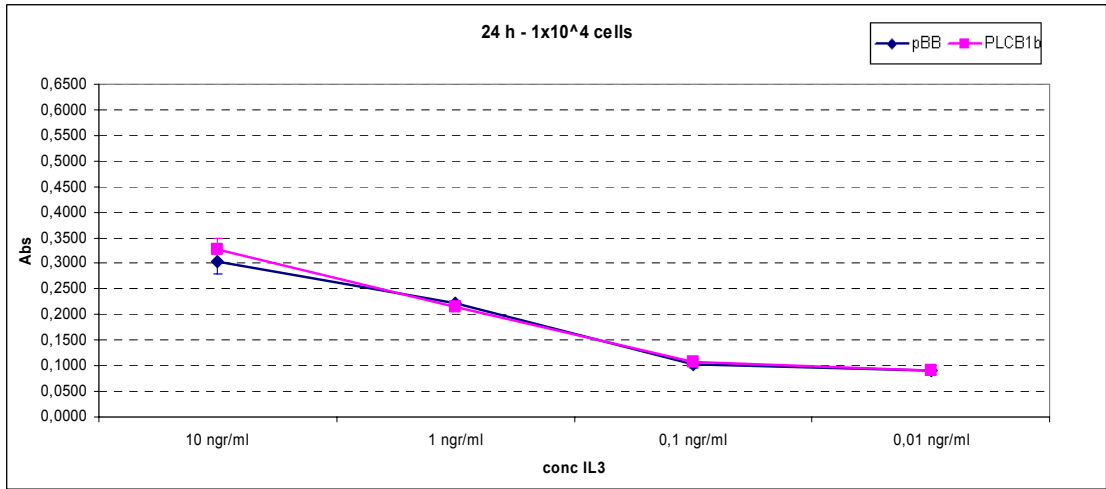
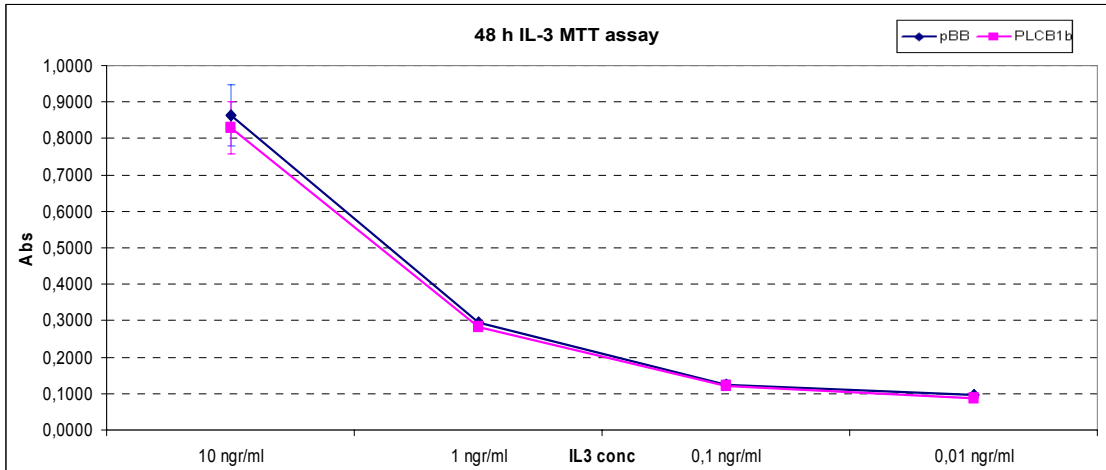
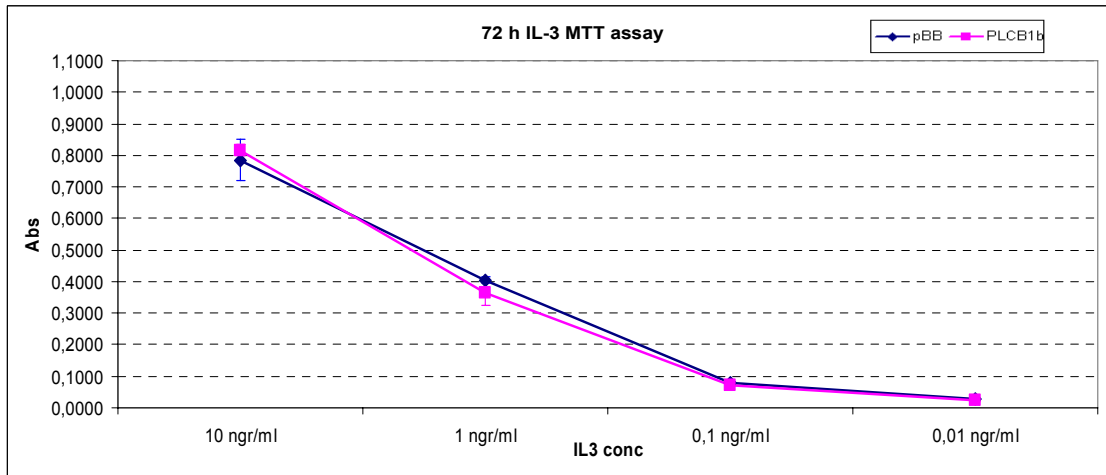


Figura 28. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi converte il sale di tetrazolio a cristalli di formazano. in cellule metabolicamente attive

Gli effetti della deprivazione di IL3 sulla proliferazione cellulare di cellule overesprimenti la PLC β 1b e controllo, sono stati valutati a diversi tempi (24h, 48h, 72h, 96h) e utilizzando concentrazioni decrescenti di IL3 (10 ngr/ml; 1ngr/ml; 0,1ngr/ml; 0,01 ngr/ml). L'esperimento è stato condotto in triplicato su tre replicati biologici. Come si può osservare dai grafici, gli andamenti delle curve sono sovrapponibili e non si evidenzia un vantaggio proliferativo delle Felc-PLC β 1b conferito dall'overespressione della proteina. (Figura 29)

A**B****C**

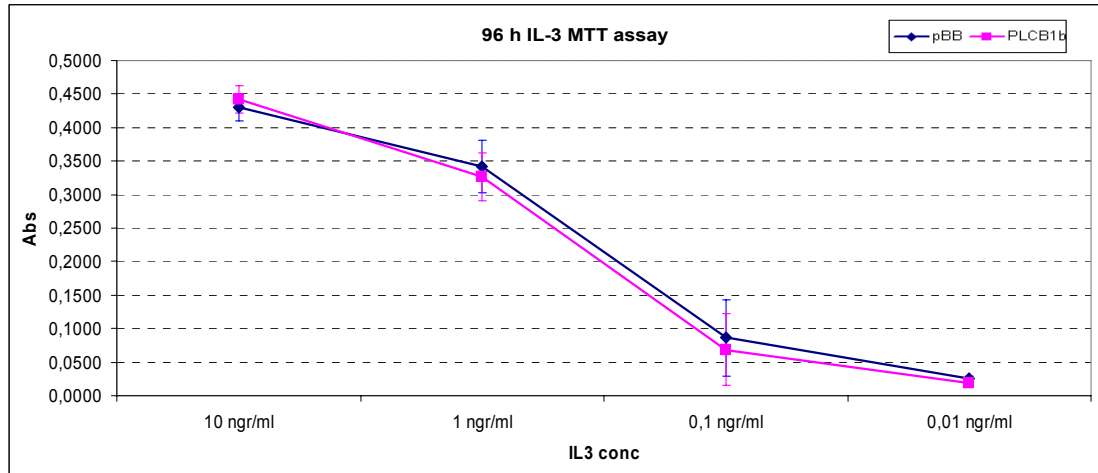
D

Figura 29. Curve di proliferazione delle linee cellulari Ba/F3-pBB e Ba/F3-PLC β 1b a diversi tempi sperimentali: 24h (A), 48 h (B), 72 h (C), 96 h (D) e in risposta a concentrazioni decrescenti di IL3 (10 ngr/ml; 1ngr/ml; 0,1ngr/ml; 0,01 ngr/ml)

4.2. Capacità trasformante

Considerato il ruolo della PLC β 1b nelle sindromi mielodisplastiche ⁽⁶²⁾, è stato valutato se l'overespressione della PLC β 1b sia in grado di conferire un potere trasformante in cellule linfoidi. E' stato quindi effettuato un saggio clonogenico, che consiste nel seminare su terreno semisolido di metilcellulosa le cellule di controllo Ba/F3-pBB e le cellule Ba/F3-PLC β 1b utilizzando concentrazioni decrescenti di IL3 (1 ngr/ml, 0.1 ngr/ml, 0.01 ngr/ml). Le colonie, definite tali solo se il numero di cellule complessive risulta essere superiore a 50, sono state contate dopo 7 giorni di coltura e i risultati dei tre replicati biologici sono riportati negli istogrammi rappresentati in Figura 30. Come si può osservare, non ci sono differenze significative nel numero di colonie tra la linea di controllo e la linea che overesprime la PLC β 1b. Anche la morfologia delle colonie non evidenzia differenze (dati non riportati).

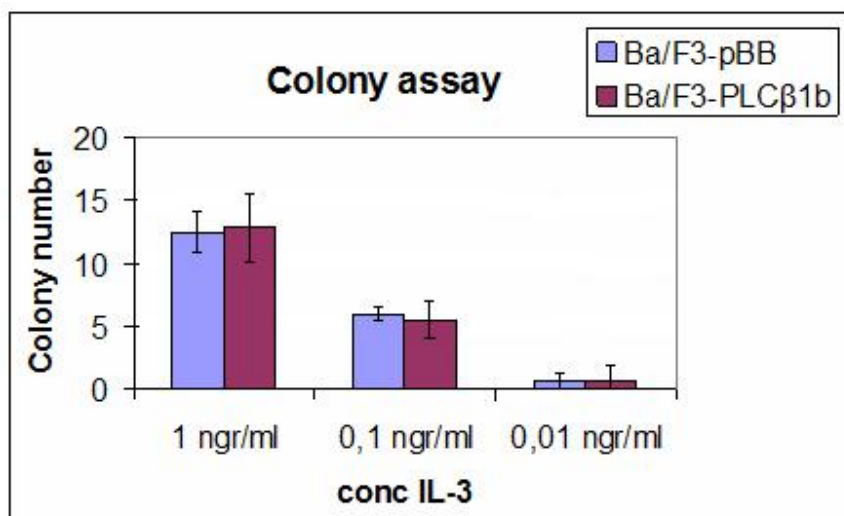


Figura 30. Valutazione del potere trasformante. Gli istogrammi riportano il numero di colonie osservate, derivanti dalla media di tre replicati biologici

4.3. Risposta allo stimolo mitogenico IGF1-mediato

Alla luce delle importanti interazioni tra il signaling mediato da IGF-1 e il ruolo della PLCβ1 già dimostrati in letteratura ⁽⁵⁴⁾, si è valutato l'effetto mitogenico anche sul modello linfoide.

Per valutare differenze sulla proliferazione indotta da IGF-1 si sono condotti tre distinti replicati di test MTT. Le cellule sono state seminate con una concentrazione di 1 ngr/ml di IL-3 sufficiente a garantirne la sopravvivenza e con concentrazioni crescenti del fattore IGF-1: 20 ngr/ml; 50 ngr/ml; 100 ngr/ml; 200 ngr/ml; 350 ngr/ml; 500 ngr/ml. Si sono osservate le risposte proliferative delle cellule controllo e quelle overesprimenti la PLCβ1b a tre diversi punti sperimentali (3h, 24h, 48h). Osservando gli andamenti di crescita riportati nei grafici in Figura 31, si nota come la risposta mitogenica sia presente in entrambe le linee, ma non sono evidenziabili vantaggi conferiti dall'overespressione della proteina nella linea FELC-PLCβ1b rispetto al controllo.

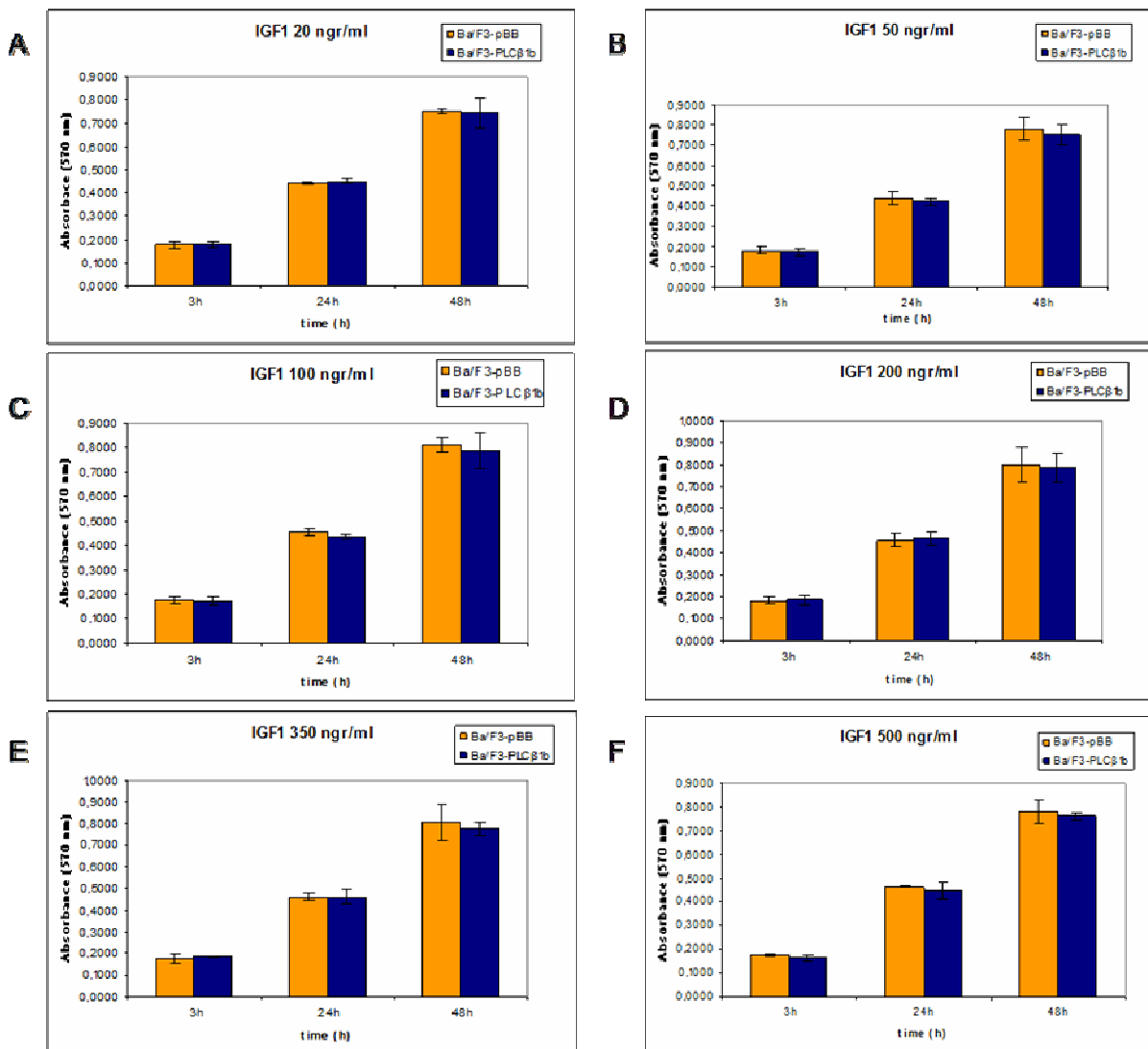


Figura 31. Proliferazione delle linee cellulari Ba/F3-pBB e Ba/F3-PLCβ1b a diversi tempi sperimentali (3h, 24h, 48h) e in risposta a concentrazioni crescenti di IGF-1: 20 ngr/ml (A); 50 ngr/ml (B); 100 ngr/ml (C); 200 ngr/ml (D); 350 ngr/ml (E), 500 ngr/ml (F)

4.4. Risposta apoptotica

E' stata infine valutata la capacità della PLCβ1b overespressa nel modello linfocitario di conferire resistenza alla morte cellulare programmata. Per valutare questo tipo di risposta la linea di controllo Ba/F3-pBB e la linea Ba/F3-PLCβ1b sono state esposte ad agenti stressogeni quali perossido di idrogeno e mitomicina C, in grado di indurre apoptosi.

Il perossido di idrogeno (H₂O₂) induce un processo di stress ossidativo all'interno della cellula con produzione di radicali liberi. E' stata costruita una curva dose-risposta sulla linea di controllo Ba/F3-pBB: sono state testate le concentrazioni di 500 μM, 250 μM e 100 μM per un tempo di

30 minuti, 2h, 4h, 6h, 24h e 48h. La vitalità delle cellule è stata valutata mediante conta manuale in triplicato con Trypan Blue.

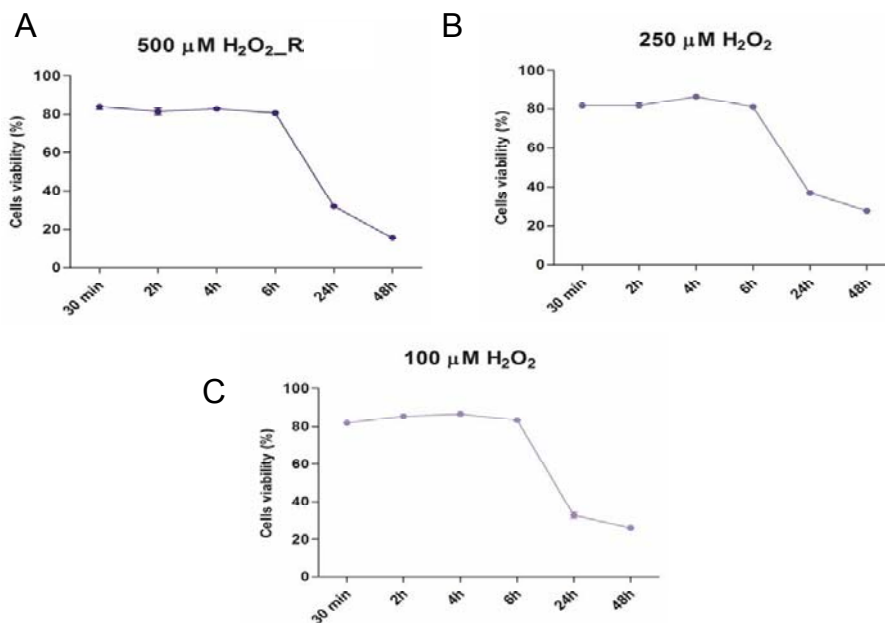


Figura 32. Curve dose-risposta su cellule Ba/F3-pBB sottoposte a trattamento con 500 μM H₂O₂ (A), 250 μM H₂O₂ (B), 100 μM H₂O₂ (C) a tempi di 30 minuti, 2h, 4h, 6h, 24h, 48h

Con tutte le differenti concentrazioni testate, la vitalità cellulare si mantiene costante fino a 6h, poi diminuisce notevolmente a 24h e 48h (Figura 32). È stato quindi scelto di trattare le cellule Ba/F3-pBB e Ba/F3-PLCβ1b con 250μM H₂O₂ per 2h, 6h e 24h.

Valutando la vitalità cellulare mediante conta manuale in triplicato con Trypan Blue (Figura 33) si osserva come la vitalità diminuisce nel tempo, indice che le cellule vanno effettivamente incontro a morte cellulare. Tuttavia, non sono emerse differenze statisticamente significative tra cellule che overesprimono la PLCβ1b e i controlli.

Per verificare che nelle cellule trattate sia stato indotto il processo di morte cellulare programmata, è stato effettuato un immunoblotting utilizzando marcatori dell'apoptosi precoci e tardivi quali caspasi 3, PARP (*poly-ADP-ribose polymerase*) e p53. I lisati di cellule Ba/F3-PLCβ1b e Ba/F3-pBB (1×10^7) proliferanti e trattate con H₂O₂ per 2h, 6h, 24h sono stati quindi separati su SDS-PAGE al 6% e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. Come mostrato in Figura 34 la membrana è stata infine incubata con gli anticorpi indicati.

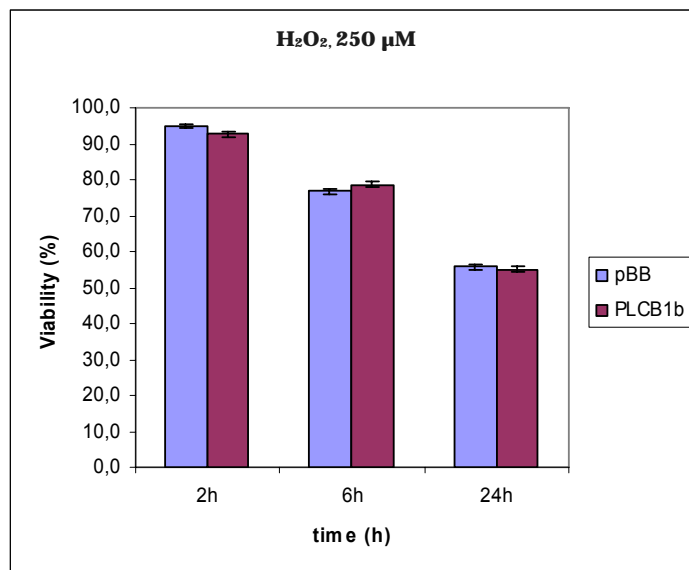


Figura 33. Vitalità cellulare (%) di cellule Ba/F3-pBB e Ba/F3-PLCβ1b sottoposte a trattamento con 250 μM H₂O₂ a tempi di 30 minuti, 2h, 6h, 24h

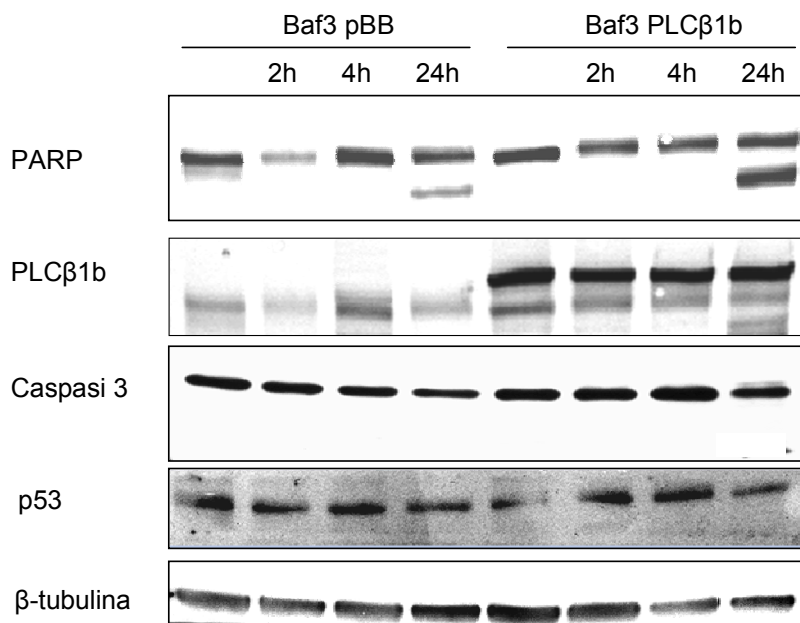


Figura 34. Immunoblot anti-PARP, anti-caspasi3 e anti-p53 per valutare la progressione apoptotica precoce e tardiva in seguito a trattamento con 250 μM H₂O₂, nella linea di controllo e quella overesprimente la PLCβ1b

I dati confermano l'andamento della curva dose-risposta: a 24h si attiva il meccanismo di apoptosi in entrambe le linee cellulari sottoposte a trattamento con 250 μM di H_2O_2 . Questa attivazione si riflette soprattutto sull'espressione della caspasi 3 e di PARP, che appartengono allo stesso *pathway* di induzione della risposta apoptotica. La forma inattiva di caspasi 3, definita pro-caspasi, ha un peso molecolare di 37kDa (Figura 34); quando si innesca l'apoptosi la proteina subisce un clivaggio che la rende attiva, producendo due piccole subunità di 12 e 17 kDa (dati non riportati) con azione proteolitica. Tra i substrati a valle della caspasi 3 attiva, vi è PARP. Anche PARP è presente in forma inattiva, corrispondente alla banda di 116 kDa riportata in Figura 34, e in una forma clivata attiva di 89kDa. Il frammento di 89kDa, dunque l'attivazione di PARP compare in corrispondenza delle 24 h di trattamento con 250 μM di H_2O_2 in entrambe le linee cellulari (Figura 34) ed è corrispondente alla diminuzione, ovvero all'attivazione della pro-caspasi3. Da questi dati, però non sono riscontrabili differenze nei livelli di espressione dei marcatori apoptotici tra le cellule che overesprimono le PLC β 1b e i controlli, allo stesso tempo di trattamento.

La Mitomicina C (MMC) è un agente alchilante in grado di provocare mutazioni e rotture a doppio filamento sul DNA. Per ottimizzare i tempi e le concentrazioni di trattamento è stata costruita una curva dose-risposta sulla linea di controllo Ba/F3-pBB: sono state testate le concentrazioni di 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di MMC per tempi di 30 minuti, 2h, 4h, 24h, 48h e 72h. La vitalità cellulare è stata valutata mediante conta manuale in triplicato con Trypan Blue (Figura 35): con entrambe le concentrazioni la vitalità si mantiene costante fino a 4h, poi diminuisce notevolmente a 24h. A 72h non sono evidenziabili cellule vive.

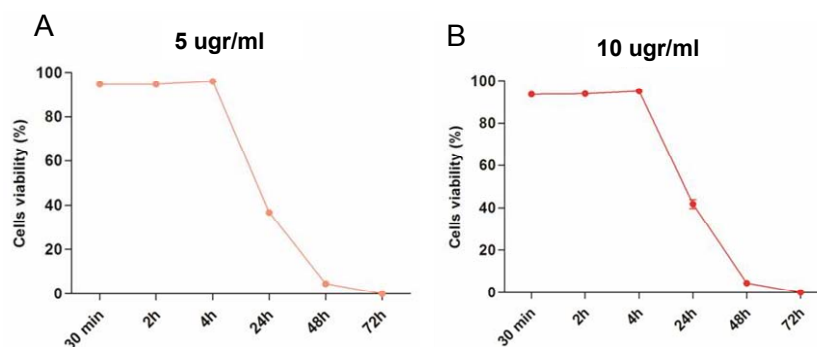


Figura 35. Curve dose-risposta su cellule Ba/F3-pBB sottoposte a trattamento con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMC (A), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMC (B), a tempi di 30 min, 2h, 4h, 24h, 48h, 72h

E' stato quindi scelto di trattare le cellule Ba/F3-pBB e Ba/F3-PLC β 1b con 5 μ gr/ml di MMC per 30 minuti, 4h e 24h (Figura 36).

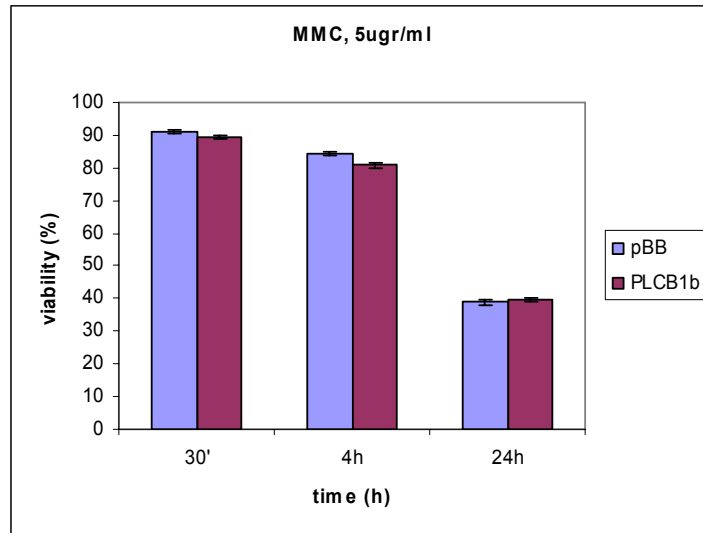


Figura 36. Vitalità cellulare (%) di cellule Ba/F3-pBB e Ba/F3-PLC β 1b sottoposte a trattamento con 5 μ gr/ml MMC a tempi di 30 minuti, 4h, 24h

Stimando la vitalità cellulare mediante conta in triplicato con *Trypan-blue*, (Figura 36) si osserva come questa diminuisce nel tempo in risposta al trattamento con MMC. Le cellule vanno quindi incontro a un processo di morte cellulare, ma non sono riscontrabili differenze significative tra la linea overesprimente la PLC β 1b e il controllo.

Per verificare l'attivazione del processo apoptotico, si è effettuato un immunoblotting usando i marcatori apoptotici già descritti (caspasi 3, PARP e p53). I lisati di cellule Ba/F3-PLC β 1b e Ba/F3-pBB (1×10^7) proliferanti e trattate con MMC per 30 minuti, 4h, 24h sono stati separati su SDS-PAGE al 6%, e le proteine trasferite su membrana di nitrocellulosa incubata con gli anticorpi come mostrato in Figura 37. Osservando la caspasi 3, notiamo come la forma non clivata diminuisce all'aumentare del tempo di trattamento, indice che già a 30 minuti si ha attivazione del pathway apoptotico in entrambe le linee cellulari. L'attivazione della caspasi 3 si riflette su PARP che viene progressivamente clivato già a 30 minuti. Tuttavia, osservando i livelli di espressione della caspasi 3 non clivata a 24h e i livelli di PARP a 30 minuti, 4h, 24h (Figura 37) possiamo notare come nelle Ba/F3 overesprimenti la PLC β 1b sia presente un ritardo nell'attivazione del pathway apoptotico. Questo suggerisce che la PLC β 1b overespressa nel modello linfoide possa conferire un resistenza all'apoptosi indotta con MMC e mediata da caspasi 3.

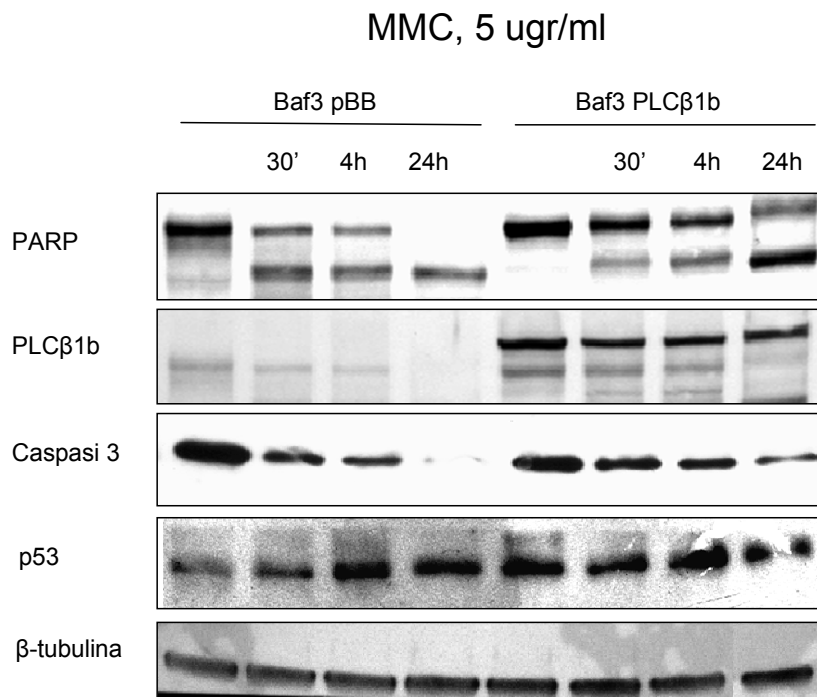


Figura 37. Immunoblot anti-PARP, anti-caspasi3 e anti-p53 per valutare la progressione apoptotica precoce e tardiva in seguito a trattamento con 5 μ gr/ml MMC nella linea di controllo e quella overesprime la PLCβ1b

5) VALUTAZIONE DEGLI INTERATTORI MOLECOLARI della PLC β 1b nel modello FELC-PLC β 1b

Sono stati isolati i nuclei da cellule FELC overesprimenti la PLC β 1b e dal controllo infettato con il vettore pBB vuoto. 1,5mg di lisato nucleare è stato immunoprecipitato con l'anticorpo anti-PLC β 1b, gli immunoprecipitati sono stati separati su gel di acrilamide gradientato 4-15% e il gel è stato colorato con Coomassie colloidale. Ciascuna *lane* del gel è stata tagliata in 13 bande e sottoposta a digestione proteolitica con tripsina, prima di procedere all'identificazione in spettrometria di massa. (Figura 39)

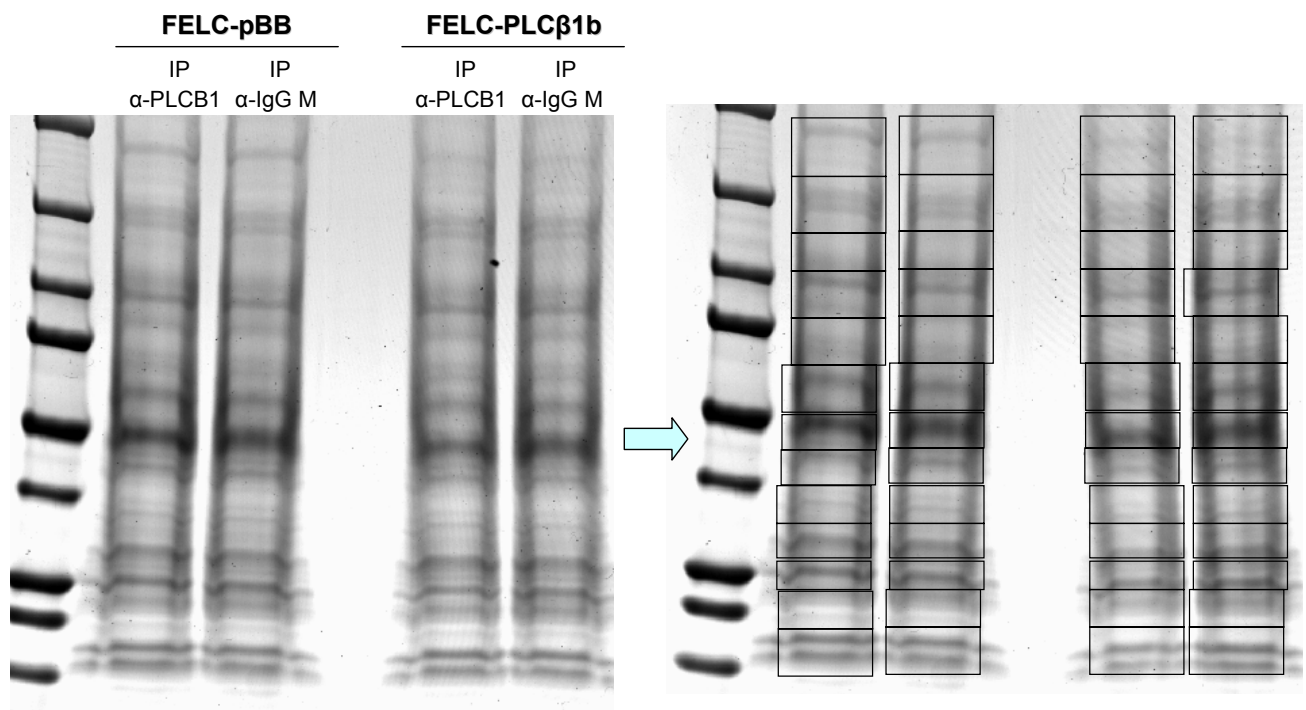


Figura 39. Immunoprecipitazione della PLC β 1 in lisati nucleari di FELC-pBB e FELC-PLC β 1b. Le proteine immunoprecipitate con anticorpo specifico anti-PLC β 1 (lanes 1 e 3) e con IgG controllo anti-mouse (lanes 2 e 4) sono state separate su gel di poliacrilamide 4-15% e il gel colorato con Coomassie colloidale. Ogni lane è stata tagliata in 13 bande, ognuna della quali sottoposta a digestione triptica per analisi MS/MS

I dati sono stati analizzati utilizzando la piattaforma Trans Proteomic Pipeline (TPP) ideata e implementata dall'Institute of System Biology di Seattle che integra al suo interno diversi software per l'analisi e la validazione statistica dei dati di spettrometria di massa. I dati *raw* ("grezzi") che si ottengono in uscita dal software collegato allo spettrometro di massa

(MassHunter), vengono convertiti nel formato *.mzXML* e quindi sottoposti a ricerca in banca dati UniProtKB utilizzando il programma open source X!Tandem. I file che si ottengono e che contengono la sequenza aminoacidica primaria dei peptidi identificati vengono quindi convertiti in formato *.pepXML* e sottoposti a validazione statistica con il programma PeptideProphet. Questo software calcola, per ogni peptide identificato, la probabilità che l'assegnazione degli spettri corrispondano alla sequenza primaria risultante, basandosi sulle proprietà della distribuzione Bayesian dei dati.⁽¹⁰⁵⁾

PeptideProphet consente di effettuare analisi *high-throughput* dei dati di spettrometria di massa, eliminando la necessità di convalidare manualmente i risultati.

Nella Figura 40 è riportata l'analisi statistica effettuata con PeptideProphet sull'interattoma della PLC β 1b nelle FELC overesprimenti la proteina. Il grafico a sinistra mostra l'andamento dell'errore, inteso come numero di false identificazioni, in relazione alla sensibilità, intesa come numero di identificazioni che vengono considerate vere. Il grafico teorico ideale presenta la curva dell'errore tendente allo 0, la corrispondente ad una sensibilità tendente a 1. PeptideProphet riporta inoltre il numero totale delle assegnazioni peptidiche corrette, in questo caso 7539,2. Nella tabella al centro, il software fornisce i valori di riferimento per individuare un valore soglia (*cutoff*) di accettabilità dei risultati: assumendo di commettere un errore massimo dello 0,05%, il numero di identificazioni corrette diminuisce a 7379. In termini di sensibilità, questo corrisponde ad un 98% di identificazioni che si assumono essere corrette, come mostrato nella tabella a destra. Il valore di riferimento per l'analisi dei dati è quindi l'MPT, definito come la minima soglia di probabilità, scelto in base alla soglia minima di errore che si ritiene di accettare per un *dataset*: in questo caso verranno ritenuti come correttamente identificati solo i peptidi con $MPT \geq 0,27$. Per le FELC-pBB invece il valore soglia selezionato è $MPT \geq 0,45$ (dati non riportati).

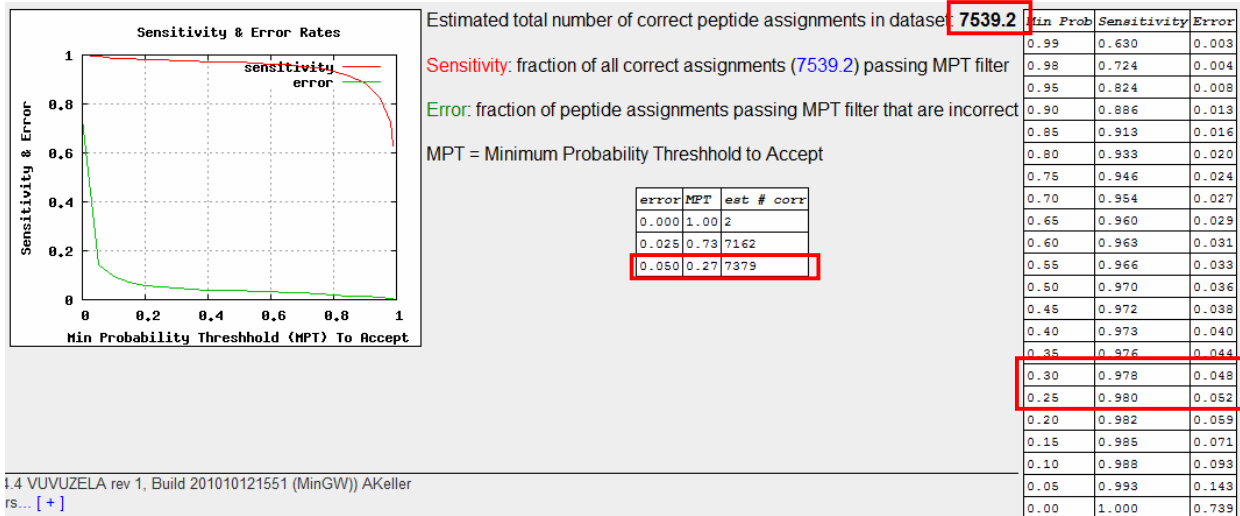


Figura 40. Output statistico nella elaborazione delle identificazioni peptidiche del software Peptide Prophet nel dataset FELC-PLC β 1b

I dati ottenuti con PeptideProphet sono stati ulteriormente elaborati con il software ProteinProphet che raggruppa i peptidi in base alla proteina da cui possono essersi generati e fornisce una probabilità modificata (“aggiustata”) rispetto a quella fornita da PeptideProphet, sulla base del numero dei peptidi appartenenti alla stessa proteina (*sibling peptides*). Se sono presenti peptidi “fratelli”, il software considera quel peptide e la proteina a cui appartiene più statisticamente significativi. Per contro, ai peptidi unici viene assegnato uno score più basso, sebbene un peptide con un’alta probabilità di identificazione sia sufficiente per identificare una proteina ⁽¹⁰²⁾.

Dopo analisi statistica dei dati, sono state identificate 93 proteine, presenti solo nelle cellule FELC overesprimenti la PLC β 1b e non nei controlli, che si ritengono essere nuovi probabili interattori nucleari della PLC β 1b (Tabella 2).

ACC Nb	PROTEIN NAME	MWT (kDa)	Prot Prob	% cov	n° unique pept
Q9Z2N8	Actin-like protein 6A	47	1	7,5	2
Q811D2	Ankyrin repeat domain-containing protein 26	180	0,9061	0,4	1
P97822-2	Isoform 2 of Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	29	0,9998	20,2	2
P28352	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	35	1	5,9	2
Q9Z1N5	Spliceosome RNA helicase Ddx39b	49	0,9528	5,1	1
P35991	Tyrosine-protein kinase BTK	76	0,8669	2,9	1
Q6PDQ2	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	218	1	3,4	6
A2A8L1	Chromodomain helicase DNA binding protein 5 (*)	222	0		0
Q6ZQ08-2	Isoform 2 of CCR4-NOT transcription complex subunit 1	266	1	1,8	4
Q6NVF9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	59	0,9627	4,5	1
Q60737	Casein kinase II subunit alpha	45	1	20,7	6
Q99LI7	Cleavage stimulation factor subunit 3	83	0,9548	2,2	1
Q91VR5	ATP-dependent RNA helicase DDX1	82	1	10,4	6
Q501J6-2	Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	46	0,9958	5,9	2
O35286	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	91	1	1,5	2
O70133-2	Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase A (*)	149	0		0
Q9QYJ0	DnaJ homolog subfamily A member 2	46	0,5077	6,1	1
P54103	DnaJ homolog subfamily C member 2	72	1	5,7	2
P13864	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	183	1	9,1	11
P62631	Elongation factor 1-alpha 2 (*)	50	0		0
P60229	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	52	1	10,6	4
Q91VC3	Eukaryotic initiation factor 4A-III (*)	47	0		0
O55135	Eukaryotic translation initiation factor 6	26	0,7153	9,8	1
P35922	Isoform ISO10 of Fragile X mental retardation protein 1 homolog	69	1	7,7	3
P70338	Zinc finger protein Gfi-1	46	0,484	2,1	1
Q8CI11-2	Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding protein-like 3	57	0,4959	3	1
Q9D902	General transcription factor IIE subunit 2	33	0,9548	6,8	1
Q8BMQ2	Isoform 2 of General transcription factor 3C polypeptide 4	91	0,574	3,8	1
P0C0S6	Histone H2A.Z	13	0,9892	14,8	1
P49312	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	34	1	30,6	10
Q9Z2X1-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	43	1	26,8	8
O35737	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (*)	49	0		0
Q3TEA8-2	Isoform 2 of Heterochromatin protein 1-binding protein 3	59	1	6,8	3
Q6P4S8	Integrator complex subunit 1	245	0,9993	1,9	2
Q60749	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	48	0,6169	4,5	1

Q6ZQ58	La-related protein 1	121	1	3,7	4
P21619-2	Isoform B3 of Lamin-B2 (*)	53	0		0
P61327	Protein mago nashi homolog	17	0,9994	19,9	2
Q9Z2D8-2	Isoform 2 of Methyl-CpG-binding domain protein 3	28	1	18,4	4
Q61881	DNA replication licensing factor MCM7	81	1	15,9	10
Q5SVQ0-2	Isoform 2 of Histone acetyltransferase MYST2	67	0,4919	3,3	1
Q9CPP0	Nucleoplasmin-3	19	1	13,1	2
Q9CQF3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	26	0,9992	9,7	2
Q99JX7	Nuclear RNA export factor 1	70	1	4,9	2
Q99LX0	Protein DJ-1	20	0,8991	10,1	1
Q6A026	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	150	0,9188	1,1	1
Q4VA53-3	Isoform 3 of Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	78	1	2,6	3
Q9DBD5	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	118	1	1,2	2
Q9Z1B3-2	Isoform B of 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	133	1	27,9	26
P62137	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	37	1	9,6	2
Q9R1C7-2	Isoform 2 of Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	104	0,5521	1,8	1
Q99PV0	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	273	0,9999	0,9	2
Q3TLH4-2	Isoform 2 of Protein PRRC2C	309	0,8349	1,7	2
Q99JF8-2	Isoform 2 of PC4 and SFRS1-interacting protein (*)	37	0		0
Q99JF8	PC4 and SFRS1-interacting protein	59	1	8,3	4
P49722	Proteasome subunit alpha type-2	26	0,9587	8,1	1
Q9R1P1	Proteasome subunit beta type-3	23	0,6652	8,8	1
P70388-2	Isoform 2 of DNA repair protein RAD50	146	1	6,8	6
P46061	Ran GTPase-activating protein 1	63	1	5,6	2
Q9CW46	Ribonucleoprotein PTB-binding 1	79	0,9989	4,9	2
O89086	Putative RNA-binding protein 3	16	0,9355	14,1	1
Q9CWZ3-2	Isoform 2 of RNA-binding protein 8A	20	0,9412	6,4	1
Q91VM5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G-like 1	42	1	18	5
P35601-2	Isoform 2 of Replication factor C subunit 1	126	0,8751	2,1	1
Q9JKY0	Cell differentiation protein RCD1 homolog	33	0,9008	4	1
O55128	Histone deacetylase complex subunit SAP18	17	0,9489	17,4	1
Q99NB9	Splicing factor 3B subunit 1	146	1	8,4	8
Q6PDM2-2	Isoform 2 of Serine/arginine-rich splicing factor 1	22	0,8368	9,4	1
Q62093	Serine/arginine-rich splicing factor 2	25	0,8247	3,6	1
P84104-2	Isoform Short of Serine/arginine-rich splicing factor 3	14	0,9607	11,3	1
Q60520	Isoform 2 of Paired amphipathic helix protein Sin3a	145	0,9995	2,4	2
Q6DIC0	Probable global transcription activator SNF2L2 (*)	180	0		0
Q3TKT4-2	Isoform 2 of Transcription activator BRG1	181	1	4,7	4

P97496-2	Isoform 2 of SWI/SNF complex subunit SMARCC1	120	1	7	5
Q6PDG5-2	Isoform 2 of SWI/SNF complex subunit SMARCC2 (*)	121	0		0
Q9CU62	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	143	1	4,2	4
Q9CW03	Structural maintenance of chromosomes protein 3	141	1	7,1	6
Q6P5D8	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	225	1	1	2
Q6P4T2	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	244	0,6144	1,2	1
P62315	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	13	1	27,7	2
Q8BMA6	Signal recognition particle 68 kDa protein	70	1	6,3	2
P32067	Lupus La protein homolog	48	0,9587	7,6	1
Q9Z1Z2	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	38	0,9847	9,4	2
Q80X82	Symplekin	142	0,8869	1,6	1
P10711-2	Isoform 1 of Transcription elongation factor A protein 1	34	0,9061	10,5	1
O08784	Treacle protein	135	1	8,1	7
Q61029-2	Isoform Delta of Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma (*)	42	0		0
Q61033	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta	75	0,9998	5,5	2
Q9DCG9	tRNA methyltransferase 112 homolog	14	0,5431	16	1
Q6NV83-2	Isoform 2 of U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	118	1	6,6	5
Q80X50-2	Isoform 2 of Ubiquitin-associated protein 2-like	107	0,7586	0,9	1
Q9JI13-2	Isoform 2 of Something about silencing protein 10	46	0,9985	7,7	2
Q5ND34-2	Isoform 2 of WD repeat-containing protein 81	92	0,843	1,7	1

Tabella 2. Elenco delle proteine identificate come interattori specifici nucleari della PLC β 1b nella linea cellulare FELC-PLC β 1b. L'*Accession number* rappresenta il codice identificativo con il quale la proteina è stata inserita nel database UniProtKB; il *Molecular Weight* indica il peso molecolare teorico della proteina calcolato in base alla sequenza primaria; la *Protein Probability* indica il punteggio statistico che Peptide Prophet attribuisce all'identificazione della proteina; la *% of coverage* esprime quanta della sequenza primaria della proteina è stata identificata; il *number of Unique Peptides* indica il numero di peptidi identificati appartenenti in maniera esclusiva ad una proteina.

(*) Le proteine che presentano *probability* uguale a 0, quelle che non riportano % coverage o che hanno n° unique peptides uguale a 0, condividono i peptidi identificati con altre isoforme

Per classificare funzionalmente le proteine identificate, è stata effettuata un'analisi di *Gene Ontology* utilizzando il software open source DAVID v.7.7 (*Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery*). Il progetto GENE ONTOLOGY è una delle grandi iniziative bioinformatiche e si pone l'obiettivo di standardizzare la rappresentazione dei geni e dei prodotti genici attraverso le specie e i database. Gene Ontology prevede una ontologia di termini specifici che elencano le proprietà della proteina in esame.

Le proteine identificate sono tutte localizzate nel compartimento nucleare, al cui interno presentano una diversa distribuzione: il 23 % si trova nel lume nucleare, il 16% si trova nel nucleoplasma, l'8% è localizzato nel nucleolo, il 6% si trova nelle strutture sub-nucleari denominate *speckles*, il 3% si trova associato alla membrana nucleare e il 2% compone la lamina nucleare. Le restanti proteine sono sempre localizzate a livello nucleare, ma più in dettaglio, appartengono a strutture funzionali specifiche: il 17% appartiene a complessi ribonucleoproteici, il 12% è localizzato a livello dello spliceosoma, l'11% si trova associato a cromosomi/cromatina e il restante 2% è parte integrante del complesso del proteasoma.

(Figura 41)

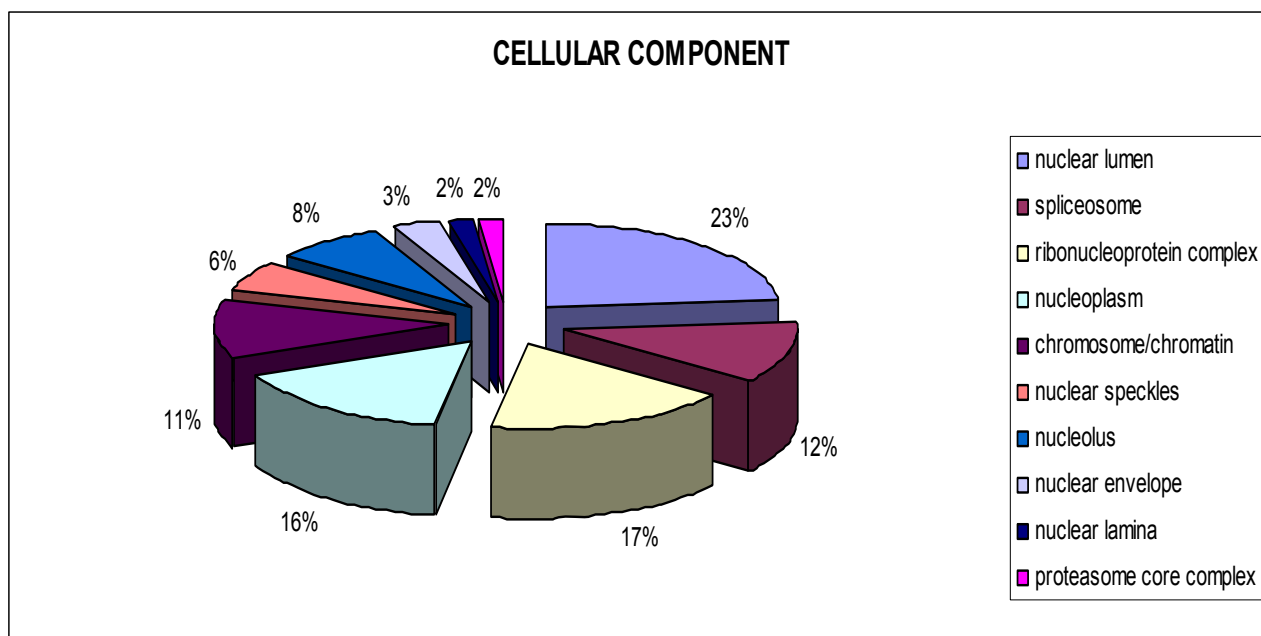


Figura 41. Rappresentazione a torta della localizzazione cellulare delle proteine identificate. Le proteine identificate localizzano nel nucleo, e in particolare sono distribuite nei compartimenti elencati

Con il software DAVID è stata anche effettuata una classificazione delle proteine in base al processo biologico in cui intervengono, e le categorie maggiormente rappresentative sono 15, come riassunto nella Figura 41.

Delle proteine identificate, 23 sono coinvolte nel processamento dell'RNA, 19 sono fattori di regolazione della trascrizione, 16 proteine sono fattori di splicing dell'RNA, 10 intervengono sulla organizzazione strutturale della cromatina, 10 sono coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, 10 sono coinvolte in processi metabolici a carico del DNA, 7 sono proteine coinvolte nelle modificazioni a livello cromatinico, 6 sono fattori di trasporto del messaggero, 6 intervengono nel trasporto di acidi nucleici, 5 sono proteine coinvolte nella replicazione del DNA, 5 sono componenti di assemblaggio macromolecolare, 3 proteine servono per l'assemblaggio della cromatina, 3 servono per la formazione di complessi proteine-DNA, 3 sono regolatori della traduzione e 3 servono per l'impacchettamento del DNA nel nucleo.

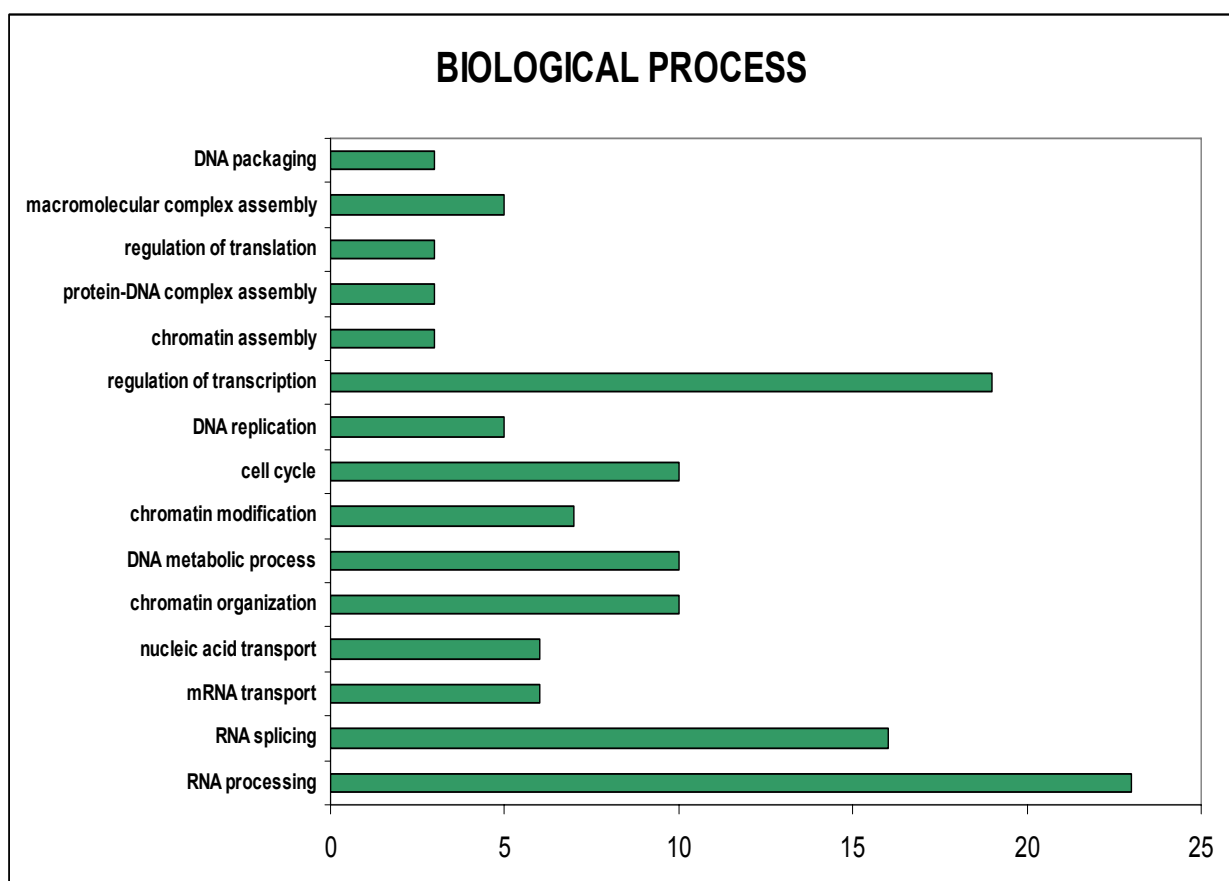


Figura 42. Rappresentazione a barre del ruolo biologico delle proteine identificate come interattori nucleari della PLC β 1b

Ci si è avvalsi di un ulteriore strumento bioinformatico, il software STRING 9.0, originariamente sviluppato per l'analisi delle mappature geniche derivanti da *macro-arrays*, allo scopo di individuare collegamenti di tipo funzionale tra le proteine identificate. Questo programma ha inizialmente richiesto una conversione dell'ID identificativo della proteina nel corrispondente ID genico per recuperare informazioni riguardanti interazioni molecolari dimostrate sperimentalmente o riportate in letteratura, cercando *key-words* corrispondenti al nome del gene all'interno di numerosi *database*.

La Figura 43 mostra la mappa degli interattori della PLC β 1b identificati in questo studio nel modello FELC-PLC β 1b: le linee blu indicano le interazioni note proteina-proteina. Maggiore è lo spessore della linea blu e maggiormente è dimostrata l'interazione tra le due proteine collegate. Ad esempio, l'interazione tra la PLC β 1 e la proteina '*lamina-associated polypeptide 2*' (codificata a partire dal gene *Tmpo*) è dimostrata da una evidenza sperimentale di co-localizzazione.⁽¹¹⁷⁾

La lacuna relativa all'interazione tra la PLC β 1 e lo *splicing factor* Srp20 dimostrata dal nostro gruppo⁽⁶⁸⁾ può essere attribuibile al fatto che STRING ricerca nei database non il nome delle proteina ma il corrispondente ID genico *Sfrs3*.

Molte delle proteine identificate appartengono effettivamente a *pathway* funzionali noti. Questo avvalora ulteriormente la significatività delle nostre identificazioni e l'efficienza dell'immunoaffinità nell'isolare i complessi funzionali di cui una proteina fa parte. Emerge infatti come la PLC β 1 sia in grado di immunoprecipitare con interattori diretti e interattori indiretti appartenenti a complessi superiori.

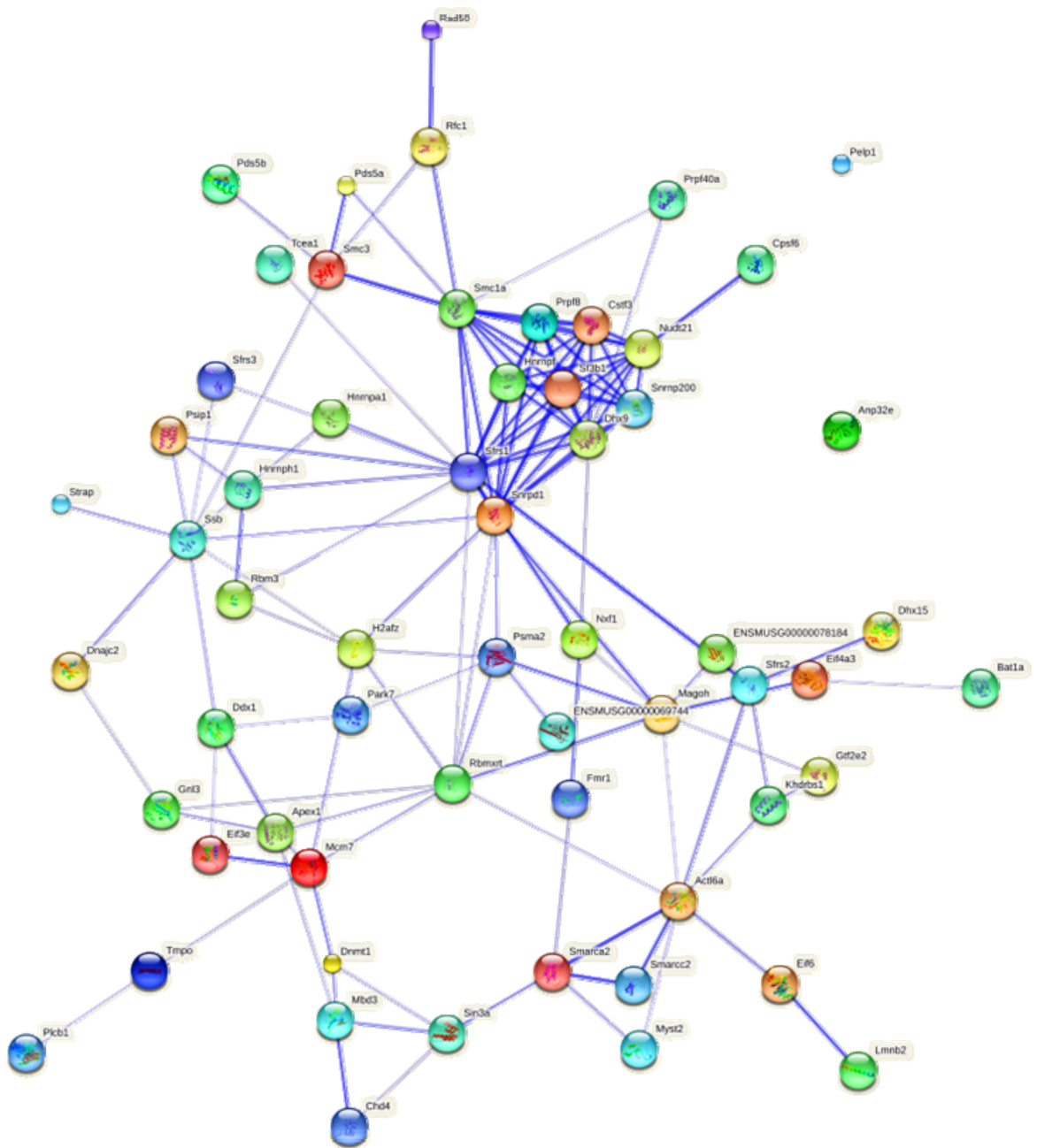


Figura 42. Mappa delle interazioni tra le proteine identificate come interattori nucleari della PLC β 1b

DISCUSSIONE

Il meccanismo di trasduzione del segnale lipidico nucleare riveste un ruolo fondamentale nella regolazione di processi cellulari quali differenziamento e proliferazione. La fosfolipasi C β 1 (PI-PLC β 1) è l'isoforma maggiormente associata al ciclo nucleare dei fosfoinositidi ed è un enzima-chiave nel *signaling* lipidico. Da studi sul differenziamento eritroide e muscolare è emerso che l'attivazione dell'isoforma β 1 della PLC nel nucleo è fondamentale per dare inizio e condurre una cascata di eventi molecolari che consentono un corretto completamento del programma differenziativo.^(49,56,57,58) Nel nucleo, l'attività idrolitica della PI-PLC β 1 sul PIP₂ genera i due secondi messaggeri IP₃ e DAG. La PI-PLC β 1 esiste in due varianti prodotte per splicing alternativo, la PI-PLC β 1a e la PI-PLC β 1b, che differiscono a livello dei residui aminoacidici C-terminali; è ormai noto che la PI-PLC β 1b è l'isoforma prevalente a livello nucleare in diversi modelli cellulari.^(36,56) In base a recenti pubblicazioni, alterazioni nell'espressione della PI-PLC β 1b risultano essere connessi alla progressione di sindromi mielodisplastiche (MDS) in leucemie mieloidi acute (AML).⁽⁶²⁾ In base a questi nuovi dati e alla luce del ruolo fondamentale della PI-PLC β 1b nel differenziamento eritroide *in vitro*,^(64,65) il progetto di ricerca qui presentato si è concentrato sullo studio di modelli cellulari murini e umani per meglio comprendere e caratterizzare il ruolo che la PI-PLC β 1 esercita a livello nucleare e i bersagli molecolari che regola nei diversi stadi dell'emopoiesi.

I modelli murini indagati sono le linee cellulari FELC e Ba/F3, rispettivamente appartenenti al *lineage* eritroide e linfoide, manipolate geneticamente in modo da ottenere un'overespressione stabile della PI-PLC β 1b. In seguito a frazionamento sub-cellulare è stata evidenziata una marcata presenza della proteina a livello nucleare, non solo nelle FELC come già noto⁽⁵⁶⁾, ma anche nelle Ba/F3, il che fa presupporre un ruolo della PLC β 1b nel compartimento nucleare anche nel *lineage* linfoide. Nel modello murino linfoide Ba/F3 il ruolo della PI-PLC β 1b è in gran parte sconosciuto, è stata quindi effettuata una caratterizzazione funzionale dell'overespressione della PI-PLC β 1b. Osservando in immunoblot i diversi livelli di espressione di marcatori apoptotici coinvolti nelle fasi precoci (caspasi3 e PARP) è emerso che l'overespressione della PI-PLC β 1b nel modello linfoide promuove un ritardo nell'innescamento del processo apoptotico, in risposta a trattamento con l'agente alchilante mitomicina C:

Nel modello murino eritroide FELC la funzione della PI-PLC β 1b è già stata ampiamente caratterizzata, per cui ci si è concentrati sulla ricerca di target molecolari: è stata infatti effettuata un'indagine di proteomica funzionale immunoprecipitando la proteina con anticorpo specifico e identificando gli interattori nucleari mediante spettrometria di massa LC-nano-ESI-Q-TOF. Questo approccio ci consente di identificare non solo le proteine che fisicamente interagiscono con la proteina d'interesse, ma anche i macro-complessi in cui queste proteine si trovano a loro

volta inserite. E' dunque fondamentale una scrupolosa analisi dei dati, avvalendosi di diversi software che consentono la creazione di network *in silico*, basati sulle informazioni depositate nelle banche dati. L'identificazione di interattori noti e di proteine che si sono già viste essere inserite nella cascata di trasduzione del segnale indotta dalla PI-PLC β 1, avvalorano ulteriormente i dati ottenuti. Tra i partner di legame è stato infatti identificato SRp20, un fattore di splicing già noto come interattore diretto della PLC β 1 in base a studi precedenti del nostro gruppo.⁽⁶⁸⁾ SRp20 ha una doppia localizzazione a livello nucleare: si trova infatti negli *speckles* e associata allo spliceosoma, dove è implicata nei processi di splicing e maturazione del pre-mRNA.^(106,107)

Un'altra proteina che risulta particolarmente interessante è l'isoforma 2 del fattore di elongazione EF1 α (EF1 α 2), in quanto recentemente identificata nel differenziamento miogenico come substrato fosforilato da PKC β I, una protein chinasi DAG dipendente presente a livello nucleare e dunque a valle dell'asse di attivazione della PI-PLC nucleare.⁽¹⁰⁸⁾ EF1 α 2 svolge un ruolo fondamentale durante la sintesi proteica ed è stata descritta ampiamente in molti sistemi cellulari, in funzione del suo coinvolgimento in stimoli proliferativi e differenziativi. Inoltre, ulteriori studi mettono in evidenza un suo ruolo come oncogene, essendo overespressa in diversi tipi tumorali (ovaio, mammella, polmone).^(109,110)

E' stata identificata tra gli interattori nucleari anche la Lamina B: si tratta di una componente della lamina nucleare interna necessaria per la stabilità dell'envelope nucleare che può interagire con la cromatina. La Lamina B è già stata oggetto di studi da parte del nostro gruppo; proprio nel modello eritroleucemico FELC è stata infatti dimostrata una sua colocalizzazione con la PLC β 1 a livello nucleare: questa interazione regola la proliferazione cellulare attraverso la transizione G2/M del ciclo cellulare.⁽¹¹¹⁾

Compiendo un'analisi di *gene ontology* e valutando il ruolo biologico dei singoli interattori è interessante notare come la maggior parte di essi si collochi in tre *pathways* funzionali in cui è stato già dimostrato un coinvolgimento specifico della PI-PLC β 1 nucleare: ciclo cellulare, proliferazione/differenziamento cellulare e regolazione della trascrizione. In particolare, sarà oggetto di ulteriori approfondimenti la proteina '*DNA replication licensing factor MCM7*', importante nel processo di replicazione del DNA; appartiene infatti al complesso MCM (*Mini Chromosome Maintenance*) essenziale per l'inizio della replicazione del genoma nella fase S del ciclo cellulare. La proteina può agire come elicasi, controllando che la replicazione del DNA avvenga solo una volta per ogni ciclo cellulare nelle cellule eucariotiche. Le proteine MCM sono overesprese in cellule cancerose e cellule pre-cancerose che vanno incontro a trasformazione maligna.⁽¹¹²⁾

Nel differenziamento, di grande interesse è soprattutto la proteina DJ, espressa specificamente negli eritroblasti e coinvolta nella risposta infiammatoria a stress ossidativi, la cui espressione aumenta notevolmente durante il differenziamento eritroide.⁽¹¹³⁾

Il maggior numero di proteine identificate è deputato alla regolazione della trascrizione, in particolar modo sono coinvolte nel processamento, splicing e trasporto del messaggero. Tra queste evidenziamo le proteine '*Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F*' e '*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H*': sono entrambe componenti del complesso ribonucleoproteico hnRNP che contribuisce attivamente al processo di maturazione e splicing del pre-mRNA.⁽¹¹⁴⁾ Altre tre proteine identificate ('*Serine-threonine kinase receptor-associated protein*', '*Spliceosome RNA helicase Ddx39b*', '*Pre-mRNA-processing-splicing factor 8*') fanno parte specificamente dello spliceosoma, grande complesso enzimatico formato da proteine e piccole molecole di RNA nucleare, responsabile dello splicing del pre-mRNA.

Tutte le proteine identificate sono localizzate nel nucleo cellulare. Sette di esse presentano una localizzazione sub-nucleare a livello degli *speckles*, siti altamente dinamici che cambiano morfologia assemblandosi e disassemblandosi durante la trascrizione dove si accumulano fattori di splicing e piccole ribonucleoproteine.^(39,40) Questo avvalorava ulteriormente la significatività delle nostre identificazioni, in quanto è stato ampiamente dimostrato che non solo la PLC β 1 si trova localizzata in queste strutture, ma anche PIP2, DGK τ , PI-PLC δ 4, PI3K C2 α , PTEN e SHIP2.^(39, 40) Questo dato rafforza inoltre l'ipotesi secondo la quale gli *speckles* giocano un ruolo importante nell'associazione tra meccanismo di trascrizione e *splicing*-post trascrizionale: gli *speckles* possono dunque essere ritenuti siti chiave per il signaling lipidico nucleare, consolidando il ruolo dei fosfoinositidi nella processazione dell'mRNA.

E' stato inoltre effettuato uno screening sui livelli d'espressione e distribuzione subcellulare della PI-PLC β 1 endogena su modelli leucemici umani (NB4, HL60, THP1, Jurkat, CEM e K562) per valutare la presenza di differenze legate allo stadio differenziativo. La proteina è maggiormente presente a livello nucleare rispetto alla frazione citoplasmatica in tutte le linee cellulari, ad eccezione delle HL60 in cui la proteina non è rilevabile in immunoblot. Gli elevati livelli di espressione basale della PI-PLC β 1 endogena e in particolare la sua localizzazione prevalentemente nucleare, consentiranno nelle prossime fasi di sviluppo del progetto l'immunoprecipitazione della proteina e l'identificazione degli interattori nucleari specifici per ogni linea "in vivo", evitando così di manipolare geneticamente le cellule, in modo da avere una visione più dettagliata sul suo coinvolgimento nella patologia leucemica. Utilizzando un approccio di *targeting mass spectrometry* si potranno identificare a quali modificazioni post-traduzionali (in particolare la fosforilazioni) la PI-PLC β 1 è soggetta nei diversi step differenziativi

dell'ematopoiesi, di cui i nostri modelli sono validi rappresentanti. Soprattutto nello studio delle fosfoproteine e dei processi fosforilativi si sono infatti 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'approccio che si intende seguire è l'identificazione di singoli residui fosforilati (in particolare serine e treonine) sulla sequenza primaria della PI-PLC β 1 nucleare immunoprecipitata da ogni linea, per meglio studiarne il ruolo funzionale.

In altri modelli cellulari è stato possibile comprendere il meccanismo di attivazione nucleare della PI-PLC β 1, riconducibile ad eventi fosforilativi su sequenze consenso da parte di specifiche chinasi.^(54,115) E' dimostrato che la fosforilazione delle altre isoforme della PLC β da parte di specifiche chinasi influenza notevolmente la capacità di legame dei lipidi e la loro associazione a molecole regolatorie.⁽¹¹⁶⁾

Questo consentirebbe di avere preziose informazioni sul meccanismo di attivazione nucleare della PI-PLC β 1 non solo in condizioni fisiologiche, ma anche nei processi patologici, e alla luce del suo importante ruolo nella proliferazione e differenziamento, potrebbe rivestire grande importanza per lo sviluppo di future strategie cliniche.

BIBLIOGRAFIA

1. Lodish, Harvey F, "*Molecular cell biology*", 5 ed.
2. Godin Isabelle & Cumano Ana, "*Hematopoietic stem cell development*", Springer ed, 2006
3. Parslow, T G, Stites, DP, Terr, AI, and Imboden JB. "*Medical Immunology*", 4 ed.
4. Awamoto, Wada, Katsura "A revised scheme for developmental pathways of haematopoietic cells: the myeloid-based model", *International Immunology*, 2010
5. Rebollo A, C Schmitt (2003). "*Ikaros, Aiolos and Helios: Transcription regulators and lymphoid malignancies*". *Immunology and Cell Biology*, 2003
6. Gianluigi Castoldi, Liso Vincenzo, "*Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*", 5ed, Milano, McGraw-Hill, 2007
7. Sergio Romagnani, Emmi Lorenzo, Almerigogna Fabio, "*Malattie del sistema immunitario seconda edizione*", Milano, McGraw-Hill, 2000
8. National Cancer Institute
9. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/>
10. Ross JA, Kasum CM, Davies SM, Jacobs DR, Folsom AR, Potter JD "*Diet and risk of leukemia in the Iowa Women's Health Study*". *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 2002
11. "*Do We Know What Causes Leukemia*". Detailed Guide: Leukemia. American Cancer Society, 2010.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. "*Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group*". *Ann Intern Med*, 1985
13. Ari Melnick and Jonathan D. Licht. "*Deconstructing a Disease: RAR{alpha}, Its Fusion Partners, and Their Roles in the Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia*". *Blood*, 1999
14. Payraastre B, Missy K, Giuriato S, Bodin S, Plantavid M, and Gratacap M, "*Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space*", *Cell Signal*, 2001
15. Karin M, "*Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease*". *Faseb J*, 1992

16. Martin TF, "Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking". *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998
17. Divecha N, Irvine RF. "Phospholipid signaling", *Cell*, 1995
18. Divecha N, Clarke JH, Roefs M, Halstead JR, D'Santos, "Nuclear inositides: inconsistent consistencies" *Cell Mol Life Sci*, 2000
19. Irvine RF. "Nuclear lipid signalling", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003
20. Martelli AM, Manzoli L, Cocco L. "Nuclear inositides: facts and perspectives", *Pharmacol Ther*, 2004
21. Lamond AI, Spector DL, "Nuclear speckles", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003
22. 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
23. Didichenko SA, Thelen M "Phosphatidylinositol 3-kinase α 2 contains a nuclear localization sequence and associates with nuclear speckles", *J Biol Chem*, 2001
24. Osborne SL, Thomas CL, Gschmeissner S, Schiavo "Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing.", *G. J Cell Sci*, 2001
25. Tabellini G, Bortul R, Santi S, Riccio M, Baldini G, Cappellini A, Billi AM, Berezney R, Ruggeri A, Cocco L, Martelli AM "Diacylglycerol kinase- θ is localized in the speckle domains of the nucleus.", *Exp Cell Res*, 2003
26. Skare P, Kreivi JP, Bergström A, Karlsson R "Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing", *Exp Cell Res*. 2003
27. Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS, Ferguson CG, Payrastre B, Myszka DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwich GD, Yuan J, "The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor", *Cell*. 2003
28. Tanaka K, Horiguchi K, Yoshida T, Takeda M, Fujisawa H, Takeuchi K, Umeda M, Kato S, Ihara S, Nagata S, Fukui Y. "Evidence that a phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein can function in nucleus." *J Biol Chem*, 1999
29. 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
30. Rhee SG. "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C", *Annu Rev Biochem*, 2001
31. Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. "PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals." *Semin Cell Dev Biol*, 2006

32. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY. "Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C". Science, 1989
33. Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. "Pleckstrin homology domains binds to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate". Nature, 1994
34. Rameh LE, Cantley LC. "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function". J Biol Chem. 1999
35. Drin G, Scarlata S. "Stimulation of phospholipase C β by membrane interactions, interdomain movement, and G protein binding--how many ways can you activate an enzyme?" Cell Signal, 2007
36. Bahk YY, Lee YH, Lee TG, Seo J, Ryu SH, Suh PG. "Two forms of phospholipase C- β 1 generated by alternative splicing". J Biol Chem, 1994
37. 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
38. Spector DL, Schrier WH, Busch H. "Immunoelectron microscopic localization of snRNPs". Biol Cell, 1983
39. Huang S, Deerinck TJ, Ellisman MH, Spector DL. "The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell nucleus", J Cell Biol. 1997
40. Pombo A, Cook PR. "The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors". Exp Cell Res. 1996
41. Lallena MJ, Martinez C, Valcarcel J, Correas I. "Functional association of nuclear protein 4.1 with pre-mRNA splicing factors". J Cell Sci. 1998
42. Peruzzi D, Aluigi M, Manzoli L, Billi AM, Di Giorgio FP, Morleo M, et al. "Molecular characterization of the human PLC β 1 gene", Biochim Biophys Acta, 2002
43. Peruzzi D, Calabrese G, Faenza I, Manzoli L, Matteucci A, Gianfrancesco F, Billi AM, Stuppia L, Palka G and Cocco L: "Identification and chromosomal localisation by fluorescence in situ hybridisation of human gene of phosphoinositide-specific phospholipase C β 1". Biochim Biophys Acta, 2000
44. Bahk YY, Song H, Baek SH, Park BY, Kim H, Ryu SH, Suh PG. "Localization of two forms of phospholipase C- β 1, a and b, in C6Bu-1 cells". Biochim Biophys Acta, 1998
45. Rhee SG. "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C" Annu Rev Biochem, 2011
46. Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI. "Members of the Gq α subunit gene family activate phospholipase C β isozymes", J Biol Chem. 1992
47. Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG. "Activation of phospholipase C isozymes by G protein β γ subunits". J Biol Chem. 1993

48. Razzini G, Brancaccio A, Lemmon MA, Guarnirei S, Falasco M. "The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta(1)". *J Biol Chem*, 2000
49. 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
50. Martelli AM, Billi AM, Manzoli L, Faenza I, Aluigi M, Falconi M, et al. "Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) beta1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation". *FEBS Lett*, 2000
51. Xu, A., Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, Gilmour RS. "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
52. 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
53. Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Rhee SG, Manzoli FA. "Nuclear phospholipase C and signaling". *Biochim Biophys Acta*. 2001
54. 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
55. 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
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
57. Faenza I, Bavelloni A, Fiume R, Lattanzi G, Maraldi NM, Gilmour, R. S, et al. "Up-regulation of nuclear PLCbeta1 in myogenic differentiation". *J Cell Physiol*, 2003
58. 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
59. Fiume R, Faenza I, Matteucci A, Astolfi A, Vitale M, Martelli AM, Cocco L. "Nuclear phospholipase C beta1 (PLCbeta1) affects CD24 expression in murine erythroleukemia cells." *J Biol Chem*. 2005
60. Kristiansen G, Sammar M, Altevogt, P. "Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule". *J Mol Histol*, 2004
61. Wenger RH, Rochelle JM, Seldin MF, Köhler G, Nielsen PJ, "The heat stable antigen (mouse CD24) gene is differentially regulated but has a housekeeping promoter", *J Biol Chem*, 1993

62. Follo MY, Bosi C, Finelli C, Fiume R, Faenza I, Ramazzotti G, Gaboardi GC, Manzoli L, Cocco L., "Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of *PI-PLCbeta1* gene expression in myelodysplastic syndrome", *Int J Mol Med*. 2006
63. 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
64. 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
65. 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
66. 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
67. Faenza I, Matteucci A, Bavelloni A, Marmiroli 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
68. 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
69. Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J, "Actions of insulin-like growth factors", *Annu Rev Physiol*, 1985
70. Schoenle E, Zapf J, Humbel RE, Froesch ER, "Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats", *Nature*, 1982
71. JA Foekens, H Portengen, M Janssen, "Insulin-like growth factor-1 receptors and insulin-like growth factor-1-like activity in human primarybreast cancer", *Cancer*, 1989
72. Guevara-Aguirre J, Balasubramanian P, Guevara-Aguirre M, Wei M, Madia F, Cheng CW, Hwang D, Martin-Montalvo A, Saavedra J, Ingles S, de Cabo R, Cohen P, Longo VD "Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans". *Sci Transl Med*, 2011
73. O. V. Chistyakova, "Signaling pathway of insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) as a potential regulator of lifespan", *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*, 2000
74. Vincent AM, Feldman EL, "Control of cell survival by IGF signaling pathways". *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 2002
75. Kuemmerle JF, "IGF-I elicits growth of human intestinal smooth muscle cells by activation of PI3K, PDK-1, and p70S6 kinase". *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2003

76. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R, "Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis". *Molecular and cellular biology*, 1999
77. Rodriguez-Tarduchy G, Collins MK, García I, López-Rivas A, "Insulin-like growth factor-1 inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells", *J Immunol*, 1992
78. Baixeras E, Jeay S, Kelly PA, Postel-Vinay MC, "The proliferative and antiapoptotic actions of growth hormone and insulin-like growth factor-1 are mediated through distinct signaling pathways in the Pro-B Ba/F3 cell line", *Endocrinology*, 2000
79. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/AllCollectionSearch/tabid/1069/Default.aspx>
80. Huang J, Mohammadi M, Rodrigues GA, Schlessinger J, "Reduced activation of RAF-1 and MAP kinase by a fibroblast growth factor receptor mutant deficient in stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis", *J Biol Chem*. 1995
81. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J, "Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity", *Mol Cell Biol*. 1998
82. Halupa A, Chohan M, Stickle NH, Beattie BK, Miller BA, Barber DL, "Erythropoietin receptor Y479 couples to ERK1/2 activation via recruitment of phospholipase Cgamma", *Exp Cell Res*. 2005
83. Yasudo H, Ando T, Xiao W, Kawakami Y, Kawakami T, "Short Stat5-interacting peptidederived from phospholipase C-β3 inhibits hematopoietic cell proliferation and myeloid differentiation", *PLoS One*. 2011
84. Graber R, Losa GA, "Changes in the activities of signal transduction and transport membrane enzymes in CEM lymphoblastoid cells by glucocorticoid-induced apoptosis", *Anal Cell Pathol*. 1995
85. Chen S, Lin F, Shin ME, Wang F, Shen L, Hamm HE, "RACK1 regulates directional cell migration by acting on G betagamma at the interface with its effectors PLC beta and PI3K gamma", *Mol Biol Cell*. 2008
86. Kremer KN, Clift IC, Miamen AG, Bamidele AO, Qian NX, Humphreys TD, Hedin KE, "Stromal cell-derived factor-1 signaling via the CXCR4-TCR heterodimer requires phospholipase C-β3 and phospholipase C-γ1 for distinct cellular responses", *J Immunol*. 2011
87. Bertagnolo V, Marchisio M, Pierpaoli S, Colamussi ML, Brugnoli F, Visani G, Zauli G, Capitani S. "Selective up-regulation of phospholipase C-beta2 during granulocytic differentiation of normal and leukemic hematopoietic progenitors". *J Leukoc Biol*. 2002
88. Lukinovic-Skudar V, Donlagic L, Banfić H, Visnjic D, "Nuclear phospholipase C-beta1b activation during G2/M and late G1 phase in nocodazole-synchronized HL-60 cells". *Biochim Biophys Acta*. 2005

89. Csete ME, Doyle JC. "Reverse engineering of biological complexity". *Science*, 2002
90. Albert B. "The cell as a collection of protein machines". *Cell*, 1998
91. Tyres M, Mann M. "From genomics to proteomics" *Nature*, 2003
92. Monti M, Orru S, Pagnozzi D, Pucci P. "Interaction proteomics". *Biosci Rep*, 2005
93. Joung J, Ramm E, Pabo C, "A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 2000
94. Gietz R.D., Triggs-Raine Barbara, Robbins Anne, Graham Kevin, Woods Robin, "Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system", *Mol Cel Biochem*, 1997
95. Pandey A, Mann M. "Proteomics to study genes and genomes". *Nature*, 2000
96. O' Farrell P H. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins", *J. Biol. Chem*, 1975
97. J.Govorun VM, Archakov AI. "Proteomic technologies in modern biomedical science". *Biochemistry*, 2002
98. Honore B, Ostergaard M, Vorum H. "Functional genomics studied by proteomics", *Bioassays*, 2004
99. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. "Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry". *Annu. Rev. Biochem*, 2001
100. Aebersold R, Goodlett DR. "Mass spectrometry in proteomics". *Chem. Rev*, 2001
101. J. Cottrell JS. "Protein identification by peptide mass fingerprinting". *Pept Res*, 1994
102. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R, "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search", *Anal Chem*. 2002 Oct 15
103. Godovac-Zimmermann J, Brown LR. "Perspective for mass spectrometry and functional proteomics". *Mass Spectrom Rev*, 2001
104. Lin D, Tabb DL, Yates JR. "Large-scale protein identification using mass spectrometry" *Biochim Biophys Acta*, 2003
105. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search", *Anal Chem*, 2002
106. Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI, "The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution", *Embo J*, 1996

107. Misteli T, Caceres JF, Clement JQ, Krainer AR, Wilkinson MF, Spector DL “*Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo*”, J Cell Biol, 1998
108. Piazzini M, Bavelloni A, Faenza I, Blalock W, Urbani A, D'Aguzzano S, Fiume R, Ramazzotti G, Maraldi NM, Cocco L, “*eEF1A phosphorylation in the nucleus of insulin-stimulated C2C12 myoblasts: Ser53 is a novel substrate for protein kinase C β 1*”, Mol Cell Proteomics, 2010
109. Lee JM. “*The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer*”, Reprod Biol Endocrinol. 2003 Oct
110. 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
111. Roberta Fiume, Giulia Ramazzotti, Gabriella Teti, Francesca Chiarini, Irene Faenza, Giovanni Mazzotti, Anna Maria Billi and Lucio Cocco, “*Involvement of nuclear PLC β 1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression*”, The FASEB Journal, 2008
112. Takizawa N., Kimura H., Sugimoto K. “*Sequence of mouse CDC47, a member of the minichromosome maintenance (Mcm) family involved in the DNA replication licensing system*”, Gene, 1995
113. Xu X., Martin F., Friedman J.S., “*The familial Parkinson's disease gene DJ-1 (PARK7) is expressed in red cells and plays a role in protection against oxidative damage*”, Blood Cells Mol. Dis., 2010
114. Carninci P., Kasukawa T., Katayama S., Gough J., Frith M.C., Maeda N., Oyama R., Ravasi T., Lenhard B., Wells C., Kodzius R., Shimokawa K., Bajic V.B., Brenner S.E., Batalov S., Forrest A.R., Zavolan M., Davis M.J. Hayashizaki Y., “*The transcriptional landscape of the mammalian genome.*”, Science, 2005
115. Omozuanvbo Aisiku, Louisa Dowal, Suzanne Scarlata, “*Protein kinase C phosphorylation of PLC β 1 regulates its cellular localization*”, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011
116. Yue C, Ku CY, Liu M, Simon MI, Sanborn BM, “*Molecular mechanism of the inhibition of phospholipase C beta 3 by protein kinase C.*”, J Biol Chem. 2000
117. Wright CD, Chen Q, Baye NL, Huang Y, Healy CL, Kasinathan S, O'Connell TD, “*Nuclear alpha1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes*, Circ Res, 2008