

Alma Mater Studiorum – Università degli Studi di Bologna

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

SETTORE DISCIPLINARE BIO/16

**RUOLO DELLA FOSFOLIPASI C- β 1
NEL DIFFERENZIAMENTO
MIOGENICO: IDENTIFICAZIONE
DI NUOVI TARGET NUCLEARI**

Presentata da: Dott.ssa Giulia Ramazzotti

Coordinatore:
Chiar.mo Prof.
Lucio Cocco

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Lucia Manzoli

Ciclo XX
Esame finale anno 2008

INDICE

INTRODUZIONE	5
1.1 Il processo di differenziamento miogenico	6
1.2 Le fosfolipasi C (PLC).....	8
1.2.1 Organizzazione strutturale delle isoforme della PLC	9
1.2.2 I domini strutturali delle PLC	11
1.2.3 Regolazione dell'attività catalitica della PLC- β 1	16
1.2.4 Ruolo delle PLC nel differenziamento muscolare	19
1.3 Inositolo Fosfato Multichinasi (Ipmk)	22
SCOPO DELLA TESI	25
MATERIALI E METODI	27
2.1 Colture cellulari e induzione del differenziamento.....	28
2.2 Trasfezione transiente	28
2.3 Mutagenesi sito-specifica e costruzione di vettori di espressione	29
2.4 Preparazione di omogenati cellulari totali e misurazione della concentrazione proteica	30
2.5 Elettroforesi SDS-PAGE e analisi mediante western blot.....	31
2.6 Microscopia a fluorescenza.....	31
2.7 Saggio di attività della PLC in vitro	32
2.8 Valutazione dell'attivazione del promotore della ciclina D3.....	32
2.9 Estrazione di RNA, retrotrascrizione e <i>real-time</i> PCR.....	33
2.10 Valutazione del profilo di espressione genica mediante PCR <i>array</i>	34
2.11 Valutazione dell'attivazione dei fattori di trascrizione attraverso <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	35

RISULTATI	37
3.1 Creazione del mutante della PLC- β 1: scelta dei residui per la mutagenesi e valutazione della sua attività catalitica.....	38
3.2 Distribuzione cellulare del mutante cataliticamente inattivo nei mioblasti C2C12....	41
3.3 Effetti del mutante privo di attività catalitica sull'espressione dei marcatori differenziamento miogenico	42
3.4 Effetti del mutante H331A/H378A sull'attivazione del promotore della ciclina D3 .	43
3.5 Analisi in <i>real-time</i> PCR dei livelli di espressione della ciclina D3.....	45
3.6 Profilo di espressione genica dei mioblasti C2C12 stimolati con insulina	47
3.7 Attivazione di NF-kB durante il differenziamento miogenico	49
3.8 La trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1 attiva c-jun nel differenziamento miogenico.....	50
3.9 Effetti della mutazione del sito consenso di c-jun sull'attivazione PLC- β 1- dipendente del promotore della ciclina D3	53
3.10 IPMK: un possibile mediatore della via attivata dalla PLC- β 1 nel differenziamento miogenico.....	56
DISCUSSIONE	58
BIBLIOGRAFIA	64

INTRODUZIONE

1.1 Il processo di differenziamento miogenico

Il differenziamento miogenico è un processo finemente regolato, caratterizzato dal susseguirsi di una serie di eventi ben definiti, quali la proliferazione dei mioblasti, la loro uscita dal ciclo cellulare, la fusione delle cellule per formare miotubi multinucleati e la conseguente maturazione delle fibre. Il differenziamento miogenico richiede l'interazione di numerosi processi cellulari e il succedersi di una serie di eventi regolati da numerosi *check point* attivi a livello trascrizionale¹⁻⁶. In particolare vengono coinvolte due grandi famiglie di fattori di trascrizione: la famiglia MyoD dei *Muscle Regulatory Factors* (MRF)^{7, 8} e la famiglia Mef2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) dei fattori di trascrizione contenenti MADS-box⁹. E' dunque l'equilibrio che si instaura tra i fattori che regolano positivamente la progressione del ciclo cellulare ed i fattori che inibiscono questa progressione a determinare se i mioblasti proseguiranno con la proliferazione cellulare o se al contrario andranno ad attivare il processo di differenziamento miogenico¹⁰.

I MRF sono fattori di trascrizione contenenti un dominio basico elica-loop-elica che si lega a siti consenso, denominati "E-box", presenti nelle regioni dei promotori e degli *enhancer* dei geni muscolo-specifici¹¹. Fanno parte di questa famiglia i fattori di trascrizione: MyoD, Myf5, miogenina e MRF4(Myf6)¹.

MyoD e Myf5 risultano essere espressi nei mioblasti proliferanti già prima dell'induzione del processo differenziativo, la loro attivazione prematura viene impedita da numerosi meccanismi di controllo, quali modificazioni post-traduzionali e l'associazione con repressori e con proteine che ne impediscono l'interazione con il DNA¹². L'uscita dei mioblasti dal ciclo cellulare necessita dunque dell'inattivazione di questi repressori permettendo così l'attivazione dei MRF^{13, 14}.

Al fine di promuovere l'espressione dei geni muscolo-specifici i fattori MRF sono coadiuvati dalla famiglia di fattori di trascrizione Mef2. Questa famiglia comprende quattro membri (Mef2A, Mef2B, Mef2C e Mef2D) che si legano ad una sequenza consenso ricca in A/T, presente anch'essa in numerosi promotori di geni muscolo-specifici⁹.

Mentre l'espressione forzata dei MRF in colture di cellule non di origine muscolare può causarne il differenziamento in senso miogenico, con un livello di efficienza che varia a seconda del tipo cellulare^{15, 16}, le proteine Mef2 non sono in grado da sole di indurre il programma differenziativo, consolidando quindi l'ipotesi che questi fattori ricoprono il ruolo fondamentale di "assistenti" dei fattori MRF¹⁷. Generalmente nelle regioni dei

Introduzione

promotori e degli enhancer dei geni muscolo-specifici, le E-box e i siti di legame per i fattori Mef2 si trovano in prossimità gli uni rispetto agli altri, supportando così il modello secondo il quale MyoD e Mef2 si legano al DNA e promuovono l'inizio della trascrizione in modo cooperativo¹⁸.

In seguito all'induzione del differenziamento, MyoD e Myf5 vengono attivati e vanno a modulare, seppur con cinetiche diverse, l'espressione di numerosi geni che partecipano ad un'ampia gamma di funzioni biologiche¹⁹. In particolare, nelle fasi precoci viene indotta l'espressione della miogenina e quella di due inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (*cyclin-dependent kinases*, cdk) ovvero p21^{Waf/Cip1} e p57^{KIP2}^{20, 21}. Questi due inibitori possono legarsi direttamente alle cdk o ai complessi che si formano tra le cdk e le cicline, i loro partner regolatori²², inibendone l'attività e determinando così l'arresto irreversibile della progressione del ciclo cellulare²³. L'induzione degli inibitori delle cdk causa inoltre l'attivazione di pRb (Retinoblastoma protein). Infatti essendo pRb inattivata attraverso la fosforilazione da parte delle cdk, l'inattivazione delle cdk stesse mediata dai cdk-inibitori causa la mancata fosforilazione di pRb e la sua conseguente attivazione.

In seguito all'induzione del processo differenziativo i mioblasti vengono dunque bloccati nella fase G0/G1 del ciclo cellulare, ne consegue che l'espressione della maggior parte delle cicline viene ridotta²⁴. L'unica eccezione è rappresentata dalla ciclina D3 la cui espressione al contrario viene indotta nel differenziamento miogenico²⁵.

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

1.2 Le fosfolipasi C (PLC)

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

Una di queste vie di trasduzione del segnale prevede l'idrolisi di un fosfolipide di membrana, il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂). Questa reazione è catalizzata dalle fosfolipasi C (PLC) fosfoinositide-specifiche e comporta la produzione di due importanti secondi messaggeri: l'inositolo-1,4,5-trisfosfato (Ins(1,4,5)P₃) e il diacilglicerolo (DAG). L'Ins(1,4,5)P₃ liberato si lega al suo recettore, presente a livello del reticolo endoplasmatico, causando così l'apertura dei canali del Ca²⁺ con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di questo ione e l'attivazione degli enzimi Ca²⁺-dipendenti. Inoltre l'Ins(1,4,5)P₃ può costituire il substrato di diverse chinasi e fosfatasi che generano a loro volta una serie di intermedi coinvolti anch'essi nel *signalling* intracellulare.

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

1.2.1 Organizzazione strutturale delle isoforme della PLC

Fino ad oggi nei mammiferi sono state identificate almeno 13 isoforme di PLC, che vengono suddivise in sei famiglie: $-\beta$, $-\gamma$, $-\delta$, $-\epsilon$, $-\zeta$ ed $-\eta$. Tutte queste isoforme differiscono nella loro organizzazione strutturale, nei meccanismi di regolazione e di attivazione e nella loro distribuzione tissutale²⁶.

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 Ca^{2+} per la loro attività enzimatica, fino alle forme più complesse presenti negli eucarioti superiori, che si ritengono derivare da una PLC ancestrale²⁷. Il peso molecolare di questi enzimi varia dai 70-75 kilodalton (kDa) dell'isoforma ζ ²⁸, ai circa 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 ed Y. Il confronto delle sequenze aminoacidiche delle diverse isoforme di PLC ha rivelato che le sequenze primarie di questi enzimi sono scarsamente conservate, fatta eccezione per questi due domini^{29, 30}. Infatti le PLC presentano a livello dei domini X ed Y un'omologia di sequenza pari a circa il 60%, che risulta essere superiore tra i membri appartenenti alla stessa famiglia.

La regione *linker*, compresa tra i domini X e Y, invece risulta essere molto variabile nelle diverse famiglie. Il *linker* delle isoforme β e δ infatti è costituito da 40-110 amino acidi, mentre nell'isoforma ϵ è formato da 190 residui. Nelle PLC- γ poi questa regione comprende circa 400 amino acidi organizzati in due domini SH2 (*Src Homology2*) e un dominio SH3 in grado di legare, rispettivamente, sequenze contenenti tirosine fosforilate e sequenze ricche in prolina (Fig.1).

Le isoforme delle famiglie β , γ , δ ed η contengono tutte quante un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) nella regione N-terminale. Questo dominio comprende circa 100 aminoacidi ed è in grado di legarsi a diversi polifosfoinositidi. Questo modulo è presente in numerose proteine che partecipano alla trasduzione del segnale^{31, 32}. Lo studio della struttura tridimensionale di un mutante della PLC- δ 1 di ratto, privo del dominio PH, ha evidenziato l'esistenza di due ulteriori moduli: un dominio a mano EF, localizzato tra i domini PH e X, ed un dominio C2, che in alcuni isozimi costituisce un'estensione del dominio Y³³. Entrambi questi domini sono presenti negli enzimi e delle famiglie β , γ , ζ ed η , mentre la PLC- ϵ presenta solo il dominio C2.

Introduzione

Come già ricordato, le varie famiglie presentano ognuna caratteristiche peculiari dal punto di vista strutturale. In particolare, le isoforme γ contengono un dominio PH interrotto da domini SH, mentre le isoforme β , fatta eccezione per l'isozima β_4 , sono le uniche a contenere una lunga sequenza C-terminale di circa 450 residui, posta a valle del dominio Y. Infine la PLC- ϵ presenta nella regione N-terminale un dominio di tipo RasGEF (*Ras Guanine nucleotide Exchange Factor*) e nella regione C-terminale almeno un dominio di legame per Ras (dominio RA)³⁴.

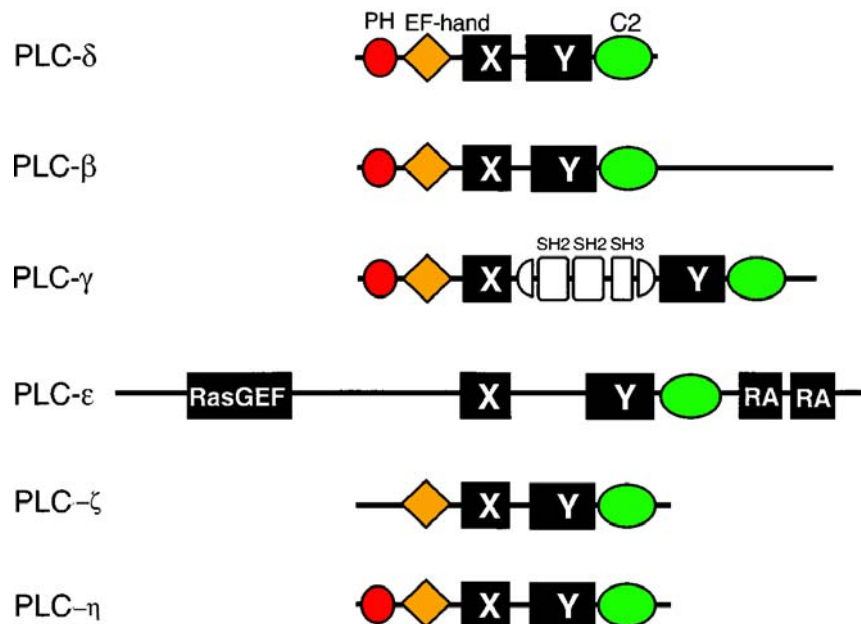


Figura1. Organizzazione strutturale delle isoforme delle PLC. Adattata da ²⁷.

1.2.2 I domini strutturali delle PLC

L'analisi cristallografica della PLC- δ 1 di ratto ha permesso di stabilire che dal punto di vista strutturale questo enzima è costituito dall'associazione di quattro domini, che sono risultati essere comuni a tutte le PLC, ovvero: il dominio PH, il dominio a mano EF, il dominio catalitico (formato dall'interazione dei domini X ed Y) ed il dominio C2^{33, 35, 36}.

- Il dominio PH

E' stato proposto che il dominio PH della PLC- δ 1 ne permetta la localizzazione a livello della membrana plasmatica, grazie alla sua affinità per il PtdIns(4,5)P₂, consentendo così all'enzima di catalizzare l'idrolisi di numerose molecole di substrato senza dissociarsi dalla superficie lipidica³³. Il dominio PH della PLC- δ 1 è inoltre in grado di legare sia il PtdIns(4,5)P₂ che l'Ins(1,4,5)P₃, con effetti differenti sulla sua attività fosfolipasica. Infatti mentre il legame col PtdIns(4,5)P₂ stimola l'attività catalitica della PLC- δ 1, l'Ins(1,4,5)P₃ esercita un effetto inibitore. Ne consegue che sia il legame dell'enzima al suo substrato lipidico che la sua attività catalitica dipendono dalla concentrazione di questi due lipidi.

Il dominio PH è presente anche nella regione N-terminale delle isoforme appartenenti alle famiglie β e γ . In questi enzimi però non sono conservati gli amino acidi basici, localizzati all'interno della tasca di legame della PLC- δ 1, che interagiscono con i gruppi fosfato in posizione 4 e 5 dell'Ins(1,4,5)P₃. A causa di questa differenza di sequenza, i domini PH delle isoforme γ non si legano al PtdIns(4,5)P₂ ma bensì al PtdIns(3,4,5)P₃, indicando che questa molecola possa partecipare al reclutamento delle PLC- γ . Anche i domini PH delle isoforme β si associano ai doppi strati lipidici, ma la loro affinità di legame non viene influenzata dalla presenza di PtdIns(4,5)P₂, che non risulta dunque essere importante per il reclutamento in membrana di questi enzimi³⁷. E' stato infatti dimostrato che il dominio PH della PLC- β 1 può legarsi in modo specifico al PtdIns(3)P, rendendo questa molecola responsabile del reclutamento dell'enzima nelle cellule in cui risulti essere attivata la PI-3 chinasi³⁸. Si può quindi concludere che i domini PH appartenenti alle diverse isoforme di PLC interagiscono con tipi diversi di polifosfoinositidi.

- Il dominio “a mano EF”

Il ruolo dei domini “a mano EF” nelle PLC non è ancora stato completamente chiarito. Questi domini possono legare il Ca^{2+} , generalmente in misura di uno ione per dominio, anche se sono state identificate alcune varianti naturali che non legano il calcio. I dati di cristallografia relativi alla struttura della PLC- $\delta 1$ suggeriscono che il suo dominio a “mano EF” sia importante per la flessibilità strutturale dell’enzima, in quanto permette l’interazione del dominio C2 e del dominio catalitico con le membrane dopo che il dominio PH ha legato il $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ^{39, 40}. Tuttavia il legame del Ca^{2+} al dominio EF della PLC- $\delta 1$ è risultato essere necessario per consentire un’efficiente interazione del dominio PH con il $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ⁴¹.

- Il dominio catalitico e il meccanismo di idrolisi dei fosfoinositidi

Il dominio catalitico è costituito dall’associazione dei domini X ed Y, ognuno dei quali va a costituire una metà di una struttura simile ad un “*TIM-barrel*” distorto e chiuso. Questo dominio contiene le regioni che presentano la maggiore omologia di sequenza tra le diverse fosfolipasi di mammifero⁴². Inoltre la regione *linker* tra i domini X ed Y è costituita da un tratto che include aminoacidi carichi indispensabili per l’attività enzimatica della PLC⁴³.

Studi strutturali svolti sulla PLC- $\delta 1$ di ratto hanno evidenziato che in questo enzima il sito attivo si trova nella regione C-terminale del *β -barrel* ed è costituito dai residui His311 e His356³³. L’analisi della struttura della PLC- $\delta 1$ cristallizzata, contenente una molecola di $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nell’incavo del sito attivo, ha permesso di individuare gli aminoacidi che interagiscono con il gruppo polare del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Fatta eccezione per il gruppo idrossilico in posizione 6, tutti gli altri gruppi presenti nell’ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ vengono riconosciuti in maniera specifica attraverso una fitta rete di legami ad idrogeno e di interazioni elettrostatiche (Fig.2). Sul fondo del sito attivo è situato inoltre uno ione calcio legato da residui aminoacidici altamente conservati, la cui mutazione è in grado di sopprimere l’attività enzimatica della PLC⁴⁴. Tutte le fosfolipasi infatti necessitano del Ca^{2+} come cofattore per la loro attività catalitica, anche se la sensibilità alla concentrazione di questo ione varia tra le diverse famiglie. Inoltre il gruppo fosfato presente in posizione 1 dell’ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ forma legami ad idrogeno con le His311 e His356 che così risultano essere anch’esse residui essenziali per l’attività catalitica dell’enzima^{44, 45}.

Introduzione

Il meccanismo di reazione proposto per l'idrolisi dei fosfoinositidi prevede la formazione di un intermedio ciclico fosfodiesterico in seguito all'attacco nucleofilo a carico del gruppo idrossilico in posizione 2 del PtdIns(4,5)P₂. La coordinazione di questo gruppo con il calcio potrebbe facilitarne la deprotonazione, così come la formazione di legami ad idrogeno con i residui Glu341 e Glu390 della PLC- δ 1. Nel passaggio successivo, l'intermedio ciclico viene idrolizzato generando Ins(1,4,5)P₃⁴⁶ (Fig.3). Studi strutturali e di mutagenesi hanno individuato nei residui His311 e His356 i possibili catalizzatori acido-base generici^{44, 45}.

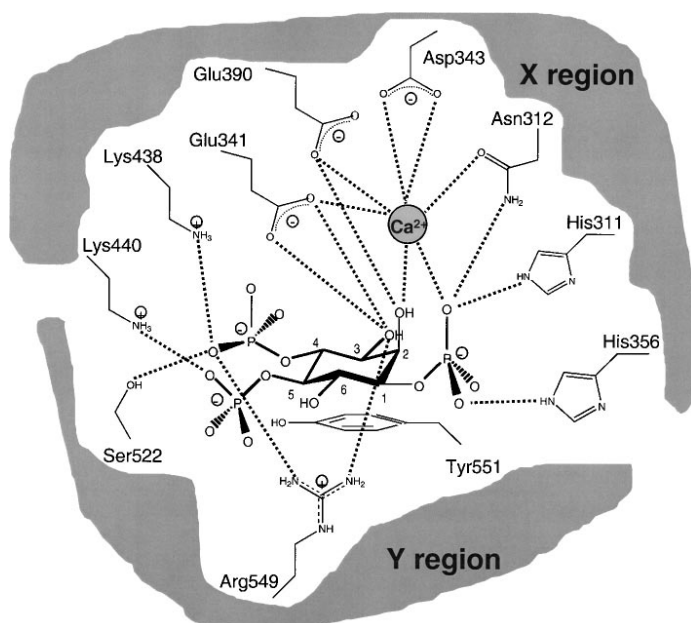


Figura 2. Rappresentazione schematica del dominio catalitico della PLC- δ 1 di ratto. Sono indicate le catene laterali dei residui che formano legami con il Ca²⁺ o con i gruppi fosfato o con i gruppi idrossilici dell'Ins(1,4,5)P₃²⁷.

Introduzione

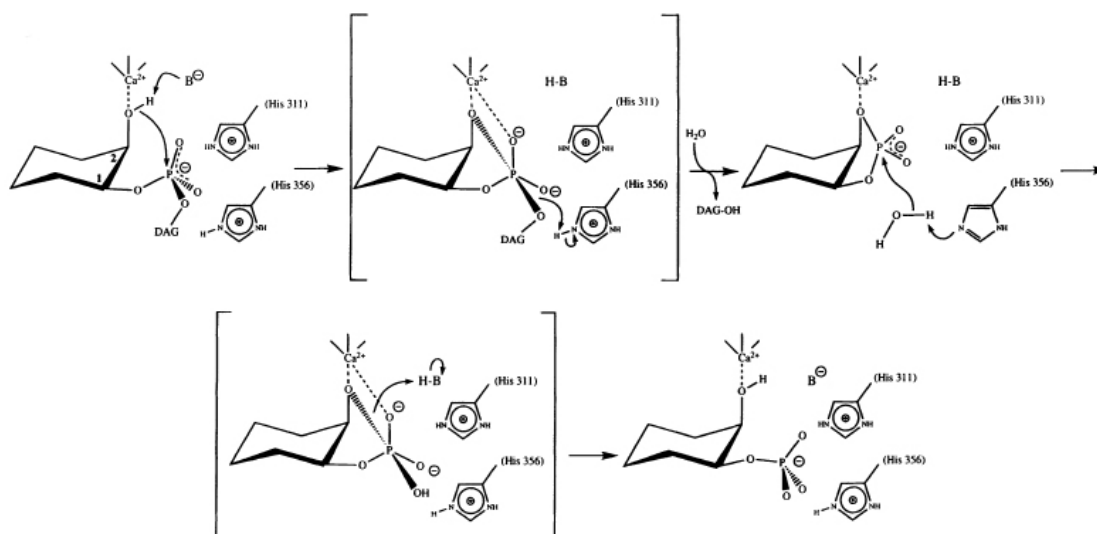


Figura 3. Meccanismo di reazione proposto per l'idrolisi del PtdIns(4,5)P₂, sono indicati gli aminoacidi His311 e His356 della PLC- δ 1³³.

- Il dominio C2

I domini C2 rappresentano dei moduli proteici, costituiti da circa 120 aminoacidi, che possono essere presenti in copia singola o multipla in numerose proteine, molte delle quali sono coinvolte nella trasduzione del segnale o nell'interazione con le membrane lipidiche⁴⁷. Molti ma non tutti i domini C2 legano il Ca²⁺ e mediano l'interazione Ca²⁺-dipendente delle proteine con i fosfolipidi. Ad esempio è stato stimato che il dominio C2 della PLC- δ 1 contenga 3 o 4 siti di legame per il Ca²⁺. Il legame dello ione al dominio C2 determina un incremento dell'affinità della PLC per il suo substrato, causando di conseguenza un aumento dell'attività catalitica dell'enzima⁴⁸.

Al contrario, i domini C2 delle PLC- β non presentano alcuna affinità per le membrane lipidiche in presenza di Ca²⁺, ma sono in grado di interagire con le subunità α attivate delle proteine G_q⁴⁹.

Introduzione

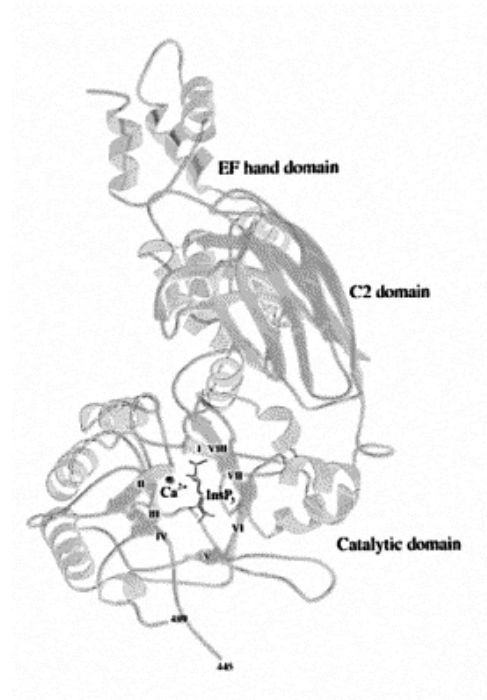
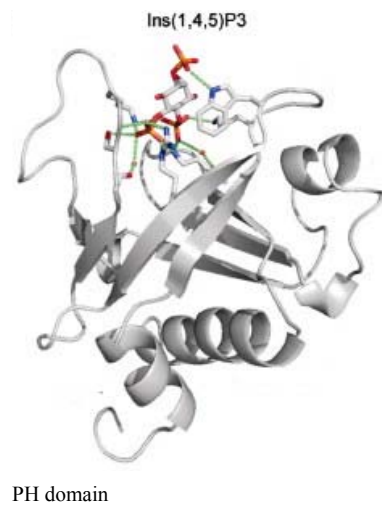


Figura 4. Struttura cristallografica della PLC- δ 1 di ratto con l'indicazione dei domini. Adattato da ref.^{26, 50}

1.2.3 Regolazione dell'attività catalitica della PLC-β1

A livello citoplasmatico la PLC-β1 viene attivata dall'interazione con le proteine G. Le proteine G eterotrimeriche sono costituite dalle subunità α , β e γ associate in maniera stabile nella loro forma inattiva che lega GDP. L'interazione tra le proteine G ed un recettore, attivato dal legame con il suo agonista, determina lo scambio del GDP con GTP a livello della subunità α e la sua conseguente dissociazione dal dimero $\beta\gamma$. Sia il complesso $G\alpha$ -GTP che il complesso $G\beta\gamma$ partecipano alla trasduzione del segnale intracellulare, mentre l'attività GTPasica intrinseca della subunità α determina l'inattivazione della trasduzione del segnale, tramite l'idrolisi del GTP a GDP, che causa la riassociazione di questa subunità al complesso $G\beta\gamma$.

In base alla loro sequenza aminoacidica e alla loro capacità di interazione con le proteine effettrici, le subunità α delle proteine G vengono suddivise in quattro sottofamiglie: $G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_q\alpha$ e $G_{12}\alpha$. La sottofamiglia G_q comprende quattro membri (α_q , α_{11} , α_{14} e α_{16}), tutti in grado di attivare la PLC-β1⁵¹. In particolare le subunità $G\alpha_q$ attivate vanno ad interagire con una regione C-terminale della PLC-β1, situata a valle del dominio Y, che contiene il dominio C2 seguito da un tratto di circa 400 aminoacidi presente solo in questa sottofamiglia delle PLC⁵². Anche le subunità $G\beta\gamma$ possono attivare la PLC-β1 interagendo invece con la regione N-terminale del dominio PH⁵³.

Per quanto riguarda la regolazione della PLC-β1 a livello nucleare, alcuni studi hanno mostrato che la subunità $G\alpha_i$ può traslocare nel nucleo⁵⁴, tuttavia non vi sono evidenze sperimentali che dimostrino che la subunità $G\alpha_q/\alpha_{11}$ sia presente in questo compartimento cellulare.

Un possibile candidato per la regolazione a livello nucleare dell'attività della PLC-β1 è risultata essere p42/44 MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). La PLC-β1 appare come l'unica tra le isoforme β a comprendere nella sua coda C-terminale un sito di fosforilazione per questa chinasi. Studi condotti sulla linea cellulare Swiss 3T3 hanno dimostrato che in seguito a stimolazione con IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*), la PLC-β1 viene iperfosforilata. L'inibizione della traslocazione di MAPK al nucleo determina la mancata fosforilazione della PLC-β1, indicando questo enzima come un possibile substrato della chinasi p42/44⁵⁵. Esperimenti effettuati sia sulla linea cellulare NIH 3T3, stimolata con insulina⁵⁶, che su colture primarie di cellule Natural Killer umane, trattate

Introduzione

con IL-2⁵⁷, hanno avvalorato questa tesi, in quanto l'inibizione dell'attività della MAPK attraverso la somministrazione dell'inibitore PD098059 ha determinato una mancata attivazione della PLC- β 1 nucleare. Inoltre è stato dimostrato che la stimolazione con IGF-I di cellule Swiss 3T3 quiescenti provoca l'attivazione di p42/44 MAPK e la sua traslocazione nel nucleo, dove va a fosforilare la PLC- β 1 sul residuo Ser982, situato nella regione C-terminale dell'enzima⁵⁸. Tuttavia questa fosforilazione non sembra essere in grado di attivare la PLC- β 1, ma piuttosto pare possa determinare il reclutamento di elementi regolatori aggiuntivi che vanno a stimolare l'attività catalitica della PLC- β 1. Nel loro insieme questi dati suggeriscono che a livello nucleare l'attivazione della PLC- β 1 richiede un meccanismo diverso e distinto rispetto a quello presente a livello della membrana plasmatica.

Per quanto riguarda l'inattivazione della PLC- β 1 a livello nucleare, pare essere causata dalla fosforilazione dell'enzima sul residuo Ser887 da parte della PCK- α , in seguito alla sua traslocazione in questo compartimento⁵⁹. Tuttavia non è ancora stato chiarito come questa fosforilazione possa determinare l'inattivazione della PLC- β 1. E' stato anche ipotizzato che nella regolazione della PLC- β 1 possano essere coinvolte le subunità G $\beta\gamma$, in quanto esperimenti condotti in vitro hanno evidenziato che la fosforilazione della PLC- β 1 non determina un'alterazione della sua attività catalitica ma piuttosto influenza la sua capacità di interagire con le subunità G $\beta\gamma$ ⁶⁰.

Introduzione

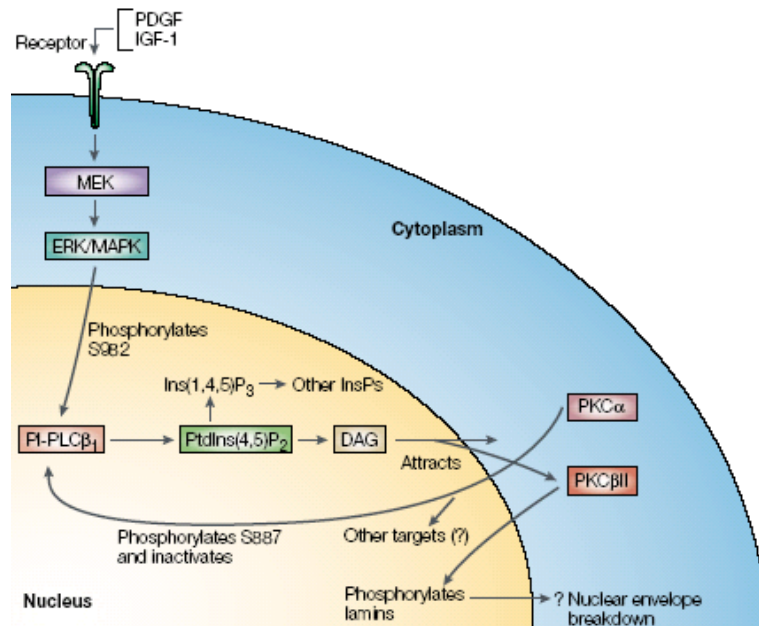


Figura 5. Meccanismi di regolazione dell'attività della PLC-β1 nucleare⁶¹.

1.2.4 Ruolo delle PLC nel differenziamento muscolare

La linea cellulare murina C2C12 rappresenta un modello riconosciuto e riproducibile del processo di miogenesi, per questo motivo è stata utilizzata per determinare il ruolo svolto dalla PLC- β 1 nel processo di differenziamento muscolare⁶². L'induzione di questo processo avviene nei mioblasti C2C12 attraverso la stimolazione con fattori di crescita appartenenti alla famiglia degli *Insulin-like Growth Factors* (IGFs), in particolare IGF-I, IGF-II e insulina⁶³.

Nei mioblasti murini C2C12 risultano essere espresse almeno tre isoforme di PLC- β , precisamente β 1, β 3 e β 4, con differente distribuzione cellulare. Infatti mentre la PLC- β 1 è localizzata prevalentemente nel nucleo, la PLC- β 3 è distribuita sia nel nucleo che nel citoplasma e la PLC- β 4 si trova esclusivamente nel compartimento citosolico. Inoltre a livello citosolico risulta essere espressa anche la PLC- γ 1⁶⁴.

Durante il differenziamento miogenico indotto da insulina l'andamento dell'espressione delle diverse isoforme della fosfolipasi C varia. Infatti mentre i livelli di PLC- β 1 e di PLC- γ 1 vengono incrementati, quelli della PLC- β 3 non subiscono variazioni^{65, 66}. Un'analisi più dettagliata circa il coinvolgimento della PLC- β 1 e della PLC- γ 1 nel differenziamento miogenico ha evidenziato che l'aumento della loro espressione è indotto nelle fasi precoci di questo processo, ovvero durante le prime 24 ore quando la troponina T, un marcatore di differenziamento miogenico, non risulta ancora essere espressa. Inoltre è stato osservato che i loro livelli di espressione aumentano progressivamente durante il processo differenziativo. Entrambe queste isoforme della PLC sono poi risultate essere necessarie per l'induzione dell'espressione della miogenina in seguito a stimolazione con insulina.

E' stato inoltre dimostrato che la localizzazione nucleare della PLC- β 1 è essenziale per l'induzione del differenziamento, come hanno evidenziato esperimenti condotti con un mutante della PLC- β 1 privato della capacità di distribuirsi al nucleo. Questo mutante si accumula a livello citosolico dove agisce da dominante negativo per la localizzazione nucleare della PLC- β 1⁶⁷. Ne consegue quindi l'inibizione della miogenesi indotta da insulina, come è stato dimostrando andando a valutare l'espressione di miogenina in seguito all'espressione del mutante citosolico⁶⁸.

Uno studio recente ha sottolineato che durante le fasi precoci del differenziamento miogenico la PLC- β 1 nucleare e la PLC- γ 1 sono entrambe in grado di regolare

Introduzione

l'espressione della ciclina D3, andando a influenzare l'attivazione del suo promotore⁶⁶. Come già menzionato, durante l'arresto del ciclo cellulare l'espressione della maggior parte delle cicline diminuisce, fatta eccezione per la ciclina D3, in quanto questa proteina ricopre un ruolo fondamentale nella fase dell'arresto del ciclo cellulare mediato da MyoD. Nelle fasi precoci del differenziamento infatti MyoD attiva la ciclina D3 che a sua volta va a sequestrare la proteina pRb non fosforilata determinando l'uscita irreversibile dei mioblasti dal ciclo cellulare⁶⁹. Coerentemente con l'osservazione che la ciclina D3 ricopre un ruolo nel differenziamento miogenico, è stata evidenziata la presenza, nella regione 5' non codificante del suo promotore, di numerose "E-box", contenenti siti di legame per i fattori di trascrizione miogenici che attivano l'espressione dei geni strutturali muscolo-specifici⁷⁰.

E' importante sottolineare però che la PLC- β 1 e la PLC- γ 1 vanno ad agire su regioni distinte del promotore della ciclina D3. Infatti mentre la regione del promotore compresa tra -446 e -190 paia di basi risulta essere attivata dall'espressione della PLC- β 1, le regioni da -1680 a -957 e da -190 al sito di inizio della trascrizione sono controllate dall'attività della PLC- γ 1⁶⁶. Questi dati suggeriscono dunque non solo che entrambe queste isoforme della PLC sono regolatori fondamentali dell'espressione della ciclina D3 nel differenziamento miogenico, ma anche che l'induzione della trasduzione del segnale PLC-dipendente da parte dell'insulina determina l'attivazione di almeno due vie distinte di segnalazione lipide-dipendenti.

L'esistenza di una relazione tra la funzione e la localizzazione della PLC- β 1 e della PLC- γ 1 sembra essere supportata da dati che hanno sottolineato l'importanza dell'organizzazione nucleare per il raggiungimento del differenziamento muscolare. E' stato ipotizzato che la PLC- β 1 nucleare, attraverso la sua azione sulla ciclina D3, possa essere coinvolta nella riorganizzazione della lamina nucleare. E' stato infatti dimostrato che nelle cellule muscolari i cambiamenti nell'organizzazione della lamina A/C possono essere influenzati dall'azione della ciclina D3 con il coinvolgimento della proteina pRb⁷¹. Studi di co-localizzazione sui mioblasti C2C12 hanno poi messo in evidenza che la PLC- β 1 nucleare è legata all'isoforma ζ della diacilglicerolo chinasi (DGK). Anche i livelli di questa chinasi aumentano durante il differenziamento miogenico e l'inibizione del suo incremento determina a sua volta un'inibizione del processo differenziativo⁷². L'associazione fisica tra questi due enzimi potrebbe essere importante dal punto di vista funzionale, in quanto la PLC- β 1 produce DAG che è il substrato della DGK che a sua

Introduzione

volta genera acido fosfatidico (PA). E' stato mostrato che il PA è a sua volta in grado di attivare la PLC- β 1 attraverso il legame con la sua regione C-terminale⁷³.

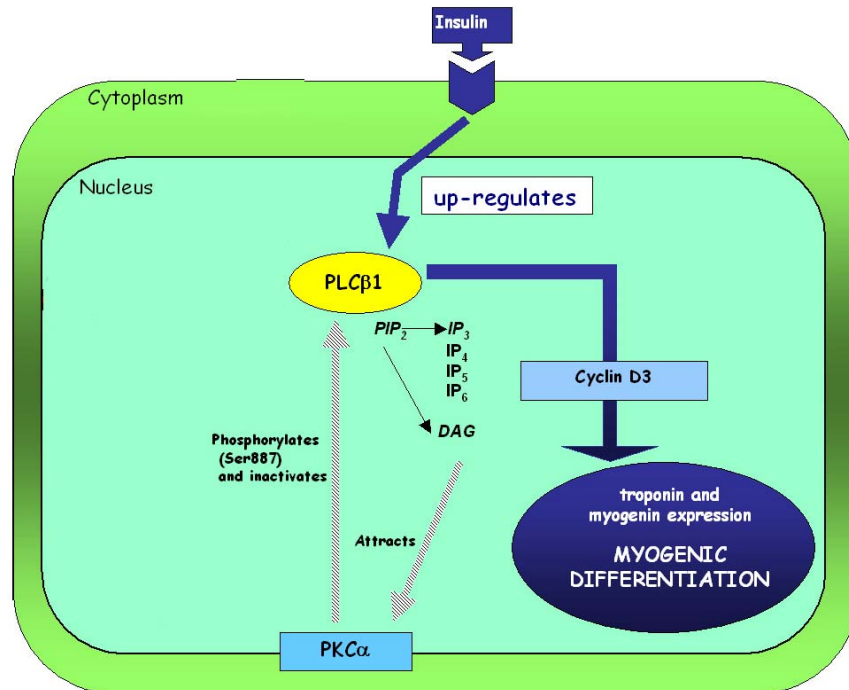


Figura 6. Ruolo della PLC- β 1 nucleare nel differenziamento miogenico indotto da insulina, nella linea cellulare murina C2C12⁷⁴.

1.3 Inositolo Fosfato Multichinasi (Ipmk)

E' stata recentemente identificata una famiglia di chinasi degli inositoli polifosfati (IPK) di cui fanno parte le chinasi dell'inositolo esachisfosfato (IP6Ks), le 3-chinasi dell'Ins(1,4,5)P₃ e l'inositolo fosfato multichinasi (IPMK o Ipk2)⁷⁵⁻⁷⁷.

Le proteine appartenenti a questa famiglia sono responsabili della produzione della maggior parte delle specie di InsP₄, InsP₅ ed InsP₆ reperibili nelle cellule eucariotiche, dal lievito all'uomo⁷⁸. Queste chinasi sono inoltre conservate in tutti gli eucarioti.

L'IPMK è in grado di fosforilare l'Ins(1,4,5)P₃ su siti multipli, producendo così Ins(1,3,4,5,6)P₅ e InsP₆ (Fig. 7). Inoltre questa chinasi può svolgere un'attività di fosfoinositide 3-chinasi andando a fosforilare in posizione 3 il PtdIns(4,5)P₂ generando in questo modo PtdIns(3,4,5)P₃. Non risulta essere ancora chiara la funzione svolta da parte del PtdIns(3,4,5)P₃ nucleare prodotto dall'IPMK, anche se è stato ipotizzato che questo fosfolipide possa essere coinvolto nella regolazione della trascrizione⁷⁹. Sono state in effetti identificate proteine nucleari regolatrici della trascrizione che agiscono da recettori per gli inositoli lipidici, compreso il PtdIns(3,4,5)P₃⁸⁰.

Studi di localizzazione hanno mostrato che l'IPMK di diverse specie localizza principalmente nel nucleo^{75,81,82}. Diversi studi hanno poi messo in evidenza che gli inositoli sono in grado di influenzare numerosi processi nucleari come la sintesi del DNA e la regolazione del ciclo cellulare (Fig. 8)⁸³. E' stato inoltre proposto che gli inositoli polifosfati nucleari possano essere coinvolti nella regolazione trascrizionale e nel rimodellamento della cromatina. E' stato dimostrato infatti che nel lievito la chinasi Ipk2 è in grado di controllare l'espressione dei geni coinvolti nelle risposte ad un ampio spettro di condizioni ambientali e nutrizionali⁷⁸.

Alcuni studi hanno evidenziato anche che gli inositoli polifosfati prodotti dalla PLC e dalle chinasi nucleari possono regolare l'esportazione del RNA messaggero dal nucleo, attraverso l'attivazione di una via di trasduzione del segnale conservata negli organismi eucarioti⁸⁴⁻⁸⁶. E' stato infatti dimostrato che la chinasi Ipk1 può interagire con le nucleoporine presenti sul lato citosolico della membrana nucleare, suggerendo così che a livello della superficie citosolica di questa membrana l'InsP₆ possa svolgere un ruolo nel controllo dell'esportazione del mRNA⁸⁷.

Infine è stato proposto che l'InsP₆ possa essere coinvolto nel mantenimento della lunghezza dei telomeri in quanto questo lipide è risultato essere un regolatore di un

Introduzione

processo di riparazione del DNA, mediato da un protein chinasi DNA-dipendente (DNA-PK), definito “*non-homologous end joining*” (NHEJ)⁸⁸.

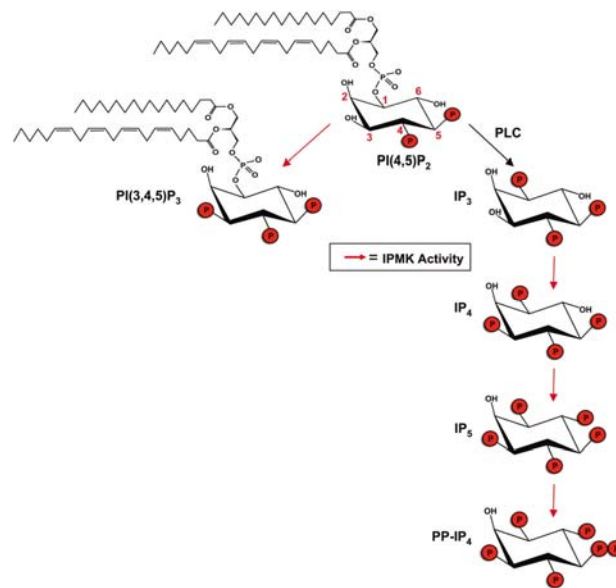


Figura 7. Rappresentazione schematica della produzione degli inositoli polifosfati. Il PtdIns(4,5)P₂ può essere fosforilato in posizione 3 dall'IPMK generando PtdIns(3,4,5)P₃ oppure può essere idrolizzato a Ins(1,4,5)P₃ dalla PLC. A sua volta l'Ins(1,4,5)P₃ può essere substrato dell'IPMK ed essere fosforilato in maniera sequenziale, producendo così diversi inositoli polifosfati⁷⁹.

Introduzione

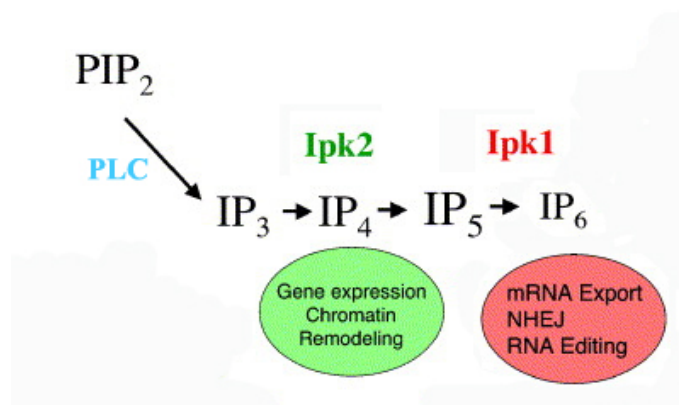


Figura8. Schema di riepilogo dei processi nucleari regolati dagli InsP messaggeri. Sono riportate gli enzimi che catalizzano le reazioni. Adattata da⁷⁸.

SCOPO DELLA TESI

Scopo della tesi

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

La 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 (PtdIns(4,5)P₂) con produzione di diacilglicerolo (DAG) e di inositolo 1,4,5-trisfosfato (Ins(1,4,5)P₃), che a loro volta agiscono come secondi messaggeri, andando ad attivare bersagli specifici coinvolti nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare.

Il processo differenziativo è inoltre caratterizzato dalla riduzione dei livelli di espressione della maggior parte delle cicline, fatta eccezione per la ciclina D3 la cui espressione al contrario aumenta. Studi condotti in precedenza dal nostro gruppo hanno individuato nel complesso ciclina D3/cdk4 uno dei bersagli della trasduzione del segnale della PLC- β 1, che è risultata essere capace di attivare il promotore della ciclina D3 durante il differenziamento miogenico. È stato inoltre dimostrato che sia l'espressione della PLC- β 1 che la sua localizzazione nucleare sono necessarie per l'induzione del programma differenziativo.

Lo scopo di questo lavoro era dunque, in primo luogo, quello di determinare se l'importanza della PLC- β 1 nel differenziamento miogenico fosse di tipo strutturale, legato quindi alla sua localizzazione nucleare, o se invece risultasse essere fondamentale l'attività catalitica dell'enzima. Di conseguenza, il nostro secondo obiettivo è stato quello di identificare i mediatori coinvolti nella via di trasduzione del segnale attivata dalla PLC- β 1 nel differenziamento miogenico.

MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari e induzione del differenziamento

La linea cellulare di mioblasti murini C2C12 è stata coltivata in terreno DMEM ad alto contenuto di glucosio (Euroclone) contenente il 10% di siero fetale bovino (*Foetal Bovine Serum*, FBS, Euroclone), questo terreno viene definito terreno di crescita (*Growth Medium*, GM). Per indurre il processo di differenziamento miogenico, quando le cellule hanno raggiunto l'80% di confluenza, il terreno GM è stato sostituito con terreno di differenziamento (*Differentiation Medium*, DM), che può essere costituito da DMEM senza siero contenente insulina 100nM (Sigma-Aldrich) oppure da DMEM contenente il 2% di FBS. In base all'esperimento, le cellule sono state mantenute in DM per 24 o 48 ore.

La linea cellulare di rene di scimmia Cos-7 è stata coltivata in terreno DMEM a basso contenuto di glucosio, contenente il 10% di FBS.

2.2 Trasfezione transiente

I mioblasti murini C2C12 sono stati trasfettati in modo transiente mediante elettroporazione, utilizzando l'apparato Amaxa Nucleofector (Amaxa), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Per ogni esperimento da 3 a 10×10^6 cellule sono state risospese in 100 μ l della soluzione di elettroporazione contenuta nel kit V (Amaxa). Alla sospensione sono stati aggiunti da 3 a 10 μ g di vettore, quindi le cellule sono state elettroporate utilizzando il programma B-32 e in seguito seminate in fiasca contenente GM. Uno o due giorni dopo la trasfezione, a seconda dell'esperimento, le cellule sono state lisate oppure il terreno di crescita è stato sostituito con quello di differenziamento.

Per la trasfezione transiente delle cellule Cos-7 è stato utilizzato il metodo dei liposomi. Il giorno precedente la trasfezione 8×10^5 cellule sono state seminate in una fiasca T25. Per la trasfezione è stato utilizzato il Polyfect Reagent (Qiagen), seguendo il protocollo standard. In breve 2,5 μ g di DNA plasmidico sono stati diluiti in terreno DMEM senza siero fino a raggiungere il volume finale di 150 μ l, a cui sono stati poi aggiunti 15 μ l di Polyfect Reagent. Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente, i complessi DNA-liposomi così formati sono stati aggiunti al terreno di crescita delle cellule. Le cellule Cos-7 sono state lisate 24 ore dopo la trasfezione.

2.3 Mutagenesi sito-specifica e costruzione di vettori di espressione

La mutagenesi sito-specifica è stata effettuata sul vettore di espressione pRc/CMV (Invitrogen) contenente l'intero cDNA codificante per la PLC-β1 di ratto⁵². In particolare sono stati mutati gli aminoacidi appartenenti al sito attivo putativo dell'enzima utilizzando il kit "QuickChange XL II site-directed mutagenesis kit" (Stratagene), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Sono state eseguite due reazioni di mutagenesi consecutive. Per la prima reazione, che determinava la sostituzione dell'istidina in posizione 331 con una alanina, è stata utilizzata la coppia di *primer*: *primer* I (5'-CTA TTT CAT CAA TTC CTC AGC CAA CAC CTA CCT CAC AGC TG-3') e *primer* II (5'-CAG CTG TGA GGT AGG TGT TGG CTG AGG AAT TGA TGA AAT AG-3)'. Mentre per la seconda reazione, avvenuta sul vettore mutato ottenuto dalla prima reazione e che ha portato alla sostituzione dell'istidina in posizione 378 con una alanina, sono stati utilizzati i primer: *primer* III (5'- GAA GAG CCT GTC ATC ACC GCT GGA TTC ACC ATG ACA AC-3') e *primer* IV (5'- GTT GTC ATG GTG AAT CCA GCG GTG ATG ACA GGC TCT TC-3'). Le basi mutate sono sottolineate. La presenza effettiva delle mutazioni nel plasmide risultante è stata verificata attraverso il sequenziamento del vettore.

Sullo stesso plasmide, ovvero il pRc/CMV contenente la PLC-β1 di ratto, è stata eseguita anche una reazione di mutagenesi con lo scopo di eliminare l'intero dominio X dell'enzima. Abbiamo utilizzato il kit "ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) con la coppia di primer: 5'-CAC AAG TCG TCA GAG GGA AGT GGT-3' e 5'- TGA CAT CTG CCC TTT CTT GGC GAG-3'.

Le sequenze della PLC-β1 *wild type* e del doppio mutante His331Ala/His378Ala sono state inoltre clonate nel vettore di espressione pEGFP-C1 (Clontech) per ottenere le loro proteine di fusione con la *Green Fluorescent Protein* (GFP), da utilizzare in studi di localizzazione cellulare. Queste sequenze sono state amplificate attraverso PCR utilizzando *primer* contenenti un sito di taglio per l'enzima di restrizione EcoRI. Dopo la digestione dei prodotti di PCR con questo enzima, i frammenti di DNA sono stati ligati nel vettore pEGFP-C1, linearizzato mediante il taglio con EcoRI. L'orientamento corretto dell'inserito è stato verificato attraverso la digestione con l'appropriato enzima di restrizione.

Il vettore contenente il cDNA dell'IPMK umano fuso con His-/GST- ci è stato gentilmente donato dal Dr. Cristoph Erneux. La sequenza codificante per l'IPMK è stata

successivamente clonata nel vettore Gateway pDonr207 (Invitrogen) e trasferita sia nel vettore pEPI GFP-C1 che nel vettore pcDNA 6.2/nLumio-dest (Invitrogen) attraverso una reazione di ricombinazione, utilizzando i kit “BP Clonase” e “LR Clonase” (Invitrogen).

Il vettore pD3-957, contenente un frammento del promotore della ciclina D3 di topo ed il gene *reporter* codificante per l'ormone della crescita umano (*human Growth Hormone*, hGH), è stato costruito come descritto in⁸⁹. Il vettore contenente il medesimo frammento del promotore della ciclina D3 ma recante il sito di legame per c-jun mutato, è stato ottenuto attraverso mutagenesi sito-specifica, eseguita su pD3-957, utilizzando il kit “QuickChange XL II site-directed mutagenesis kit” (Stratagene) ed i *primer* : 5'-CCA CTT TAG GGT AGG AGT GAC TTG ACT ATG TAC AAA GTT A-3' e 5'- TAA CTT TGT ACA TAG TCA AGT CAC TCC TAC CCT AAA GTG G- 3'. Le basi mutate sono sottolineate. La presenza delle mutazioni è stata confermata attraverso sequenziamento del vettore.

2.4 Preparazione di omogenati cellulari totali e misurazione della concentrazione proteica

Le cellule sono state risospese nel tampone di lisi M-PER (Pierce), addizionato con un cocktail di inibitori delle proteasi (Complete mini, Roche), 15 µg/ml di *calpain I inhibitor* e 7.5 µg/ml di *calpain II inhibitor* (entrambi Roche), e sono state lasciate in ghiaccio per 30 minuti, vortexando di tanto in tanto. Per rimuovere il materiale insolubile i campioni sono poi stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C ed è stato recuperato il surnatante.

La concentrazione proteica dei diversi preparati è stata determinata attraverso analisi allo spettrofotometro utilizzando il “Bradford protein assay” (Bio-Rad). In breve, 2 µl di ogni campione sono stati diluiti in 800 µl di acqua distillata, mentre per il campione bianco sono stati utilizzati 2 µl di M-PER sempre diluiti in 800 µl di acqua. Ad ogni campione, preparato in triplicato, sono stati aggiunti, vortexando, 200 µl di reagente Bradford. La loro assorbanza a 595 nm è stata misurata allo spettrofotometro e la concentrazione proteica è stata determinata interpolando i valori così ottenuti con quelli di una curva standard di BSA.

2.5 Elettroforesi SDS-PAGE e analisi mediante western blot

50 µg di ogni campione sono stati risospesi in *Laemli sample buffer* e denaturati a 100°C per 5 minuti. Le proteine sono state separate mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE). La concentrazione dei gel di poliacrilammide utilizzata è stata variata in base alla proteina analizzata, in particolare sono stati usati gel al 6% per valutare l'espressione della PLC-β1, mentre per analizzare i livelli di miogenina e di ciclina D3 sono stati utilizzati gel al 10%.

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

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anticorpo monoclonale anti-miogenina (sc-12732), anticorpi policlonali anti-PLC-β1 (sc-9050) and anti-ciclina D3 (sc-182) (tutti Santa Cruz); anticorpo monoclonale anti-β-actina (Sigma-Aldrich).

2.6 Microscopia a fluorescenza

Per la valutazione della localizzazione delle proteine di fusione con GFP le cellule C2C12 sono state fatte crescere, dopo la trasfezione, su vetrini copri-oggetto. Uno o due giorni dopo la trasfezione i vetrini sono stati lavati brevemente con PBS e le cellule sono state fissate per 10 minuti con paraformaldeide 4% in PBS(Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi nuovamente lavati in PBS e montati su vetrini utilizzando un reagente anti-fading in glicerolo. Infine i vetrini sono stati osservati e fotografati al microscopio a fluorescenza Nikon E600.

2.7 Saggio di attività della PLC in vitro

Per valutare l'attività catalitica della PLC- β 1 *wild type* e dei suoi mutanti sono stati utilizzati 20 μ g di omogenato totale di cellule Cos-7, ottenuto 24 ore dopo la trasfezione. E' stata scelta questa linea cellulare in quanto presenta un'espressione basale di PLC- β 1 molto ridotta ed inoltre mostra un'elevata capacità di espressione del DNA esogeno. Le cellule Cos-7 sono state trasfettate utilizzando i liposomi, come specificato nei paragrafi precedenti, in associazione con un vettore pRc/CMV vuoto, usato come controllo negativo, oppure con plasmidi codificanti per la PLC- β 1 *wild type*, per il doppio mutante H331A/H378A o per il mutante privato dell'intero dominio X (Δ (X)). Dopo la lisi dei campioni è stata valutata l'effettiva overespressione della PLC nei diversi preparati.

Gli estratti quindi sono stati messi ad incubare per 30 minuti a 37°C con un tampone contenente 100mM MES (acido MorpholineEthaneSulfonic) a pH 6.7; 150mM NaCl; 0.06% di sodio deossicolato e 3nmol di [3 H]PIP₂ (attività specifica: 30'000 dpm/nmol). Le reazioni sono state bloccate tramite l'aggiunta di cloroformio-metanolo-HCl e la fase acquosa è stata separata da quella organica mediante centrifugazione a 2000g per 5 minuti. La quantità di [3 H]IP₃ prodotto, presente nella fase acquosa, è stata quantificata utilizzando lo scintillatore Beckman LS 6500, mentre la fase organica è stata separata utilizzando la TLC come descritto in ⁹⁰.

2.8 Valutazione dell'attivazione del promotore della ciclina D3

Per ogni punto sperimentale sono state utilizzate 3x10⁶ cellule C2C12 co-trasfettate, mediante elettroporazione, con 4 μ g di vettore contenente il gene *reporter* e 4 μ g di vettore di espressione. Come vettore *reporter* è stato utilizzato il plasmide pD3-957, contenente un frammento del promotore della ciclina D3, oppure la sua versione mutata, pD3-957mut, in cui è stato eliminato il sito di legame di c-jun. Come vettori di espressione invece sono stati utilizzati: pGFP, come controllo, il vettore pRc/CMV codificante per la PLC- β 1 *wild type*, il vettore pRc/CMV contenente il mutante della PLC- β 1 H331A/H378A ed il vettore pcDNA 6.2/nLumio-dest codificante per l'Ipmk. Ogni campione, dopo la trasfezione, è stato suddiviso in due pozzetti di un *multiwell* da 6. L'attivazione del promotore è stata valutata 48 ore dopo la trasfezione, in seguito o meno a stimolazione delle cellule con insulina, mediante misurazione dell'hGH prodotto dai mioblasti. La misurazione è stata

ripetuta in triplicato per ogni campione su un prelievo di 200 µl di terreno, utilizzando l'hGH ELISA kit (Roche).

2.9 Estrazione di RNA, retrotrascrizione e *real-time* PCR

Per valutare i livelli di espressione della PLC-β1 e della ciclina D3 nei campioni utilizzati per il saggio del gene *reporter*, abbiamo estratto dalle cellule l'RNA totale utilizzando il "RNeasy mini kit" (Qiagen), seguendo il protocollo fornito. La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state valutate misurandone l'assorbanza a 260 e a 280 nm mediante lo spettrofotometro NanoDrop.

Per retrotrascrivere l'RNA in cDNA, a 2 µg di RNA totale sono stati aggiunti 0,5 µg di primer oligo (dT) e la miscela è stata portata ad un volume finale di 10 µl con acqua bidistillata sterile. I campioni sono stati quindi mantenuti a 65°C per 10 minuti, per eliminare le strutture secondarie degli RNA. Successivamente è stata aggiunta ad ogni campione una miscela di retrotrascrizione contenente: 200 U di trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (M-MLV RT, Promega), 25 U di inibitore delle ribonucleasi, 10mM desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP). La reazione di retrotrascrizione è avvenuta a 42°C per 1 ora.

I livelli di espressione della PLC-β1 e della ciclina D3 sono stati determinati mediante *real-time* PCR utilizzando sonde TaqMan specifiche. In particolare sono stati utilizzati per la PLC-β1 il saggio Rn01514488_m1 e per la ciclina D3 il saggio Mm01273583_m1 (Applied Biosystems). Come gene costitutivo di riferimento è stata utilizzata la GAPDH, la cui espressione è stata valutata utilizzando il saggio Mm99999915_g1 (Applied Biosystems).

Tutte le reazioni di *real-time* PCR sono state effettuate in piastre ottiche da 96 pozzetti MicroAmp Optical 96-well (Applied Biosystems) in un volume totale di 25 µl, utilizzando 12,5 µl di "TaqMan PCR universal master mix" (Applied Biosystems); 1,25 µl del saggio di interesse, contenente i primer e le sonde, e 1 µl di cDNA. La misurazione dell'espressione genica di ogni campione è stata ripetuta in triplicato. Le reazioni sono state effettuate utilizzando lo strumento ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) con le seguenti condizioni: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti seguiti da 40 cicli di 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C.

I livelli di espressione di ogni gene sono stati valutati rispetto ai livelli di espressione della GAPDH nel medesimo campione utilizzando il metodo del $\Delta\Delta C_t$, secondo il protocollo fornito con lo strumento. I risultati dei diversi esperimenti effettuati sono stati analizzati statisticamente mediante il software GraphPad Prism 3.02.

2.10 Valutazione del profilo di espressione genica mediante PCR array

Al fine di identificare le vie di trasduzione del segnale la cui attività risulta essere alterata dall'espressione del mutante H331A/H378A della PLC- β 1, abbiamo effettuato degli esperimenti di *profiling* dell'espressione genica utilizzando i PCR array.

La tecnica dei PCR array combina la capacità di quantificazione del DNA della *real-time* PCR in *SYBR Green* con la capacità dei *microarray* di valutare contemporaneamente l'espressione di numerosi geni.

Il *SYBR Green* è un colorante che si lega in maniera aspecifica al DNA a doppio filamento, creando un complesso colorante-DNA che assorbe luce blu ($\lambda_{\max} = 488$ nm) ed emette luce verde ($\lambda_{\max} = 522$ nm). L'intensità del segnale fluorescente generato è dunque proporzionale alla quantità di DNA a doppio filamento presente nella reazione. Quindi ad ogni ciclo della reazione di PCR l'intensità di segnale aumenta parallelamente all'aumentare della quantità di DNA sintetizzato. In base al numero di cicli di amplificazione necessari per ogni campione per raggiungere un determinato livello di fluorescenza è possibile determinare la quantità di cDNA di partenza, permettendo inoltre di paragonare i valori ottenuti in campioni diversi.

Per gli esperimenti di *profiling* sono stati utilizzati i "Mouse Signal transduction PathwayFinderTM RT² Profiler PCR array" (SuperArray Bioscience) che permettono di andare a valutare l'espressione di 84 geni di interesse rappresentativi di 18 diverse vie di trasduzione del segnale. Ogni piastra contiene infatti coppie di primer gene-specifiche per 84 geni rilevanti, per 5 geni costitutivi e per 3 controlli della qualità del RNA e della reazione di PCR.

Il cDNA è stato sintetizzato, partendo dai campioni di RNA ottenuti come descritto nel paragrafo precedente, utilizzando il kit "RT² First Strand Kit" (SuperArray Bioscience) seguendo il protocollo fornito. Brevemente a 1,5 μ g di RNA totale sono stati aggiunti 2 μ l di buffer GE 5X, utilizzato per eliminare il DNA genomico, e portati ad un volume finale

di 10 μ l con acqua bidistillata. I campioni sono stati incubati a 42°C per 5 minuti ed in seguito sono stati aggiunti ad ogni campione 10 μ l di cocktail RT, contenenti: 4 μ l di *buffer* di retro trascrizione (*Buffer BC3*), 1 μ l di mix contenente i primer ed un controllo esterno (Soluzione P2) e 2 μ l di mix di retrotrascrittasi (*RE3 Enzyme Mix*). I campioni sono stati portati a 42°C per 15 minuti e successivamente a 95°C per 5 minuti per degradare l'RNA e inattivare la trascrittasi inversa. Infine ogni reazione è stata diluita in 91 μ l di acqua bidistillata.

Al cDNA così diluito è stata quindi aggiunta la “RT² qPCR Master Mix” (SuperArray Bioscience), contenente *SYBR green* ed un colorante di riferimento. La miscela così ottenuta è stata aliquotata nei pozzetti della piastra da 96 dell'*array*.

Al termine della reazione di amplificazione, che si è svolta secondo le condizioni del protocollo fornito col kit, i dati relativi all'amplificazione in *real-time* sono stati raccolti utilizzando il software dello strumento ABI Prism 7300. Per analizzare i dati e paragonare i valori ottenuti nei diversi campioni, i valori di espressione di ogni singolo gene sono stati normalizzati rispetto ai valori di espressione dei geni costitutivi. Inoltre attraverso il metodo del $\Delta\Delta_{CT}$ è stata quantificata la variazione di espressione dei diversi geni nel campione esprime il mutante della PLC- β 1 rispetto al campione di controllo.

2.11 Valutazione dell'attivazione dei fattori di trascrizione attraverso *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

I livelli di attivazione dei fattori di trascrizione NF-kB ed AP-1 sono stati valutati facendo reagire gli estratti nucleari dei mioblasti C2C12 con gli oligonucleotidi consenso di questi fattori (rispettivamente sc-2505 e sc-2501, Santa Cruz Biotechnology). E' stata inoltre disegnata una sonda utilizzando un frammento del promotore della ciclina D3 contenente un possibile sito di legame per c-jun, con sequenza CCA CTT TAG GGT AGG AGT GAC CCA ACT ATG TAC AAA GTT A, ed il suo corrispettivo recante tre basi mutate nel sito consenso per c-jun (CCA CTT TAG GGT AGG AGT GAC TTG ACT ATG TAC AAA GTT A). Tutte le sonde sono state marcate con γ -³²P-ATP utilizzando la T4 polinucleotide chinasi (Roche).

I mioblasti C2C12 sono stati trasfettati con i vettori codificanti per la PLC- β 1 *wild type* e per il suo doppio mutante H331A/H378A e quindi lasciati in coltura per 24 ore. Successivamente il terreno di crescita è stato sostituito con terreno per differenziamento

Materiali e Metodi

per ulteriori 24 ore. Infine le cellule sono state recuperate e risospese in 400µl di buffer A [10mM Hepes KOK (pH 7,9); 1,5mM MgCl₂; 10mM KCl e cocktail di inibitori delle proteasi “Complete mini” (Roche)] e lasciate in ghiaccio per 10 minuti. Successivamente le sospensioni cellulari sono state vortexate per 10 secondi e centrifugate per 5 minuti a 1200 rpm a 4°C. I pellet sono quindi stati risospesi 50 µl di buffer C freddo [20mM Hepes KOH (pH 7,9); 25% glicerolo; 420mM NaCl; 1,5mM MgCl₂; 0,2mM EDTA e cocktail di inibitori delle proteasi “Complete mini” (Roche)] e lasciati in ghiaccio per 20 minuti. Infine i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 12000 rpm, è stato recuperato il surnatante e ne è stata determinata la concentrazione proteica utilizzando il “Bradford protein assay” (Bio-Rad).

Le reazioni di legame per l’EMSA sono state allestite in un volume finale di 20 µl aggiungendo a 4 µl di tampone di legame 5X (31,25mM MgCl₂; 125mM TrisHCl pH 7,9; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 50% glicerolo) 20 µg di estratto nucleare, 5pmol di oligonucleotide a doppio filamento marcato e 0,5 µg di poly(dIdC) e sono state lasciate incubare per 20 minuti a temperatura ambiente.

Le reazioni di competizione sono state preparate pre-incubando per 20 minuti gli estratti nucleari con l’equivalente oligonucleotide non marcato in eccesso, utilizzato come competitore. Per identificare i fattori responsabili del legame della sonda marcata, su alcuni campioni è stato effettuato un esperimento di *super-shift* aggiungendo all’estratto nucleare 0,1µg degli anticorpi policlonali anti-c-fos (sc-32 X) e anti-c-jun (sc-1694 X) (Santa Cruz Biotechnology). Questa incubazione è avvenuta a temperatura ambiente per 10 minuti, prima di aggiungere ai campioni la sonda marcata.

Le reazioni sono quindi state caricate su un gel non denaturante di poliacrilammide al 4% e la corsa è avvenuta secondo il protocollo standard. Infine i gel sono stati essiccati a 80°C sotto vuoto e le bande visualizzate mediante autoradiografia.

RISULTATI

3.1 Creazione del mutante della PLC- β 1: scelta dei residui per la mutagenesi e valutazione della sua attività catalitica

Per determinare se l'importanza della PLC- β 1 nel processo di differenziamento miogenico fosse di tipo strutturale, ovvero se avesse una funzione simile a quella di una "impalcatura" che permette l'interazione di altri fattori, o se invece fosse fondamentale la sua attività enzimatica, e quindi l'attivazione di vie di trasduzione del segnale dipendenti dalla PLC- β 1, abbiamo costruito un mutante della PLC- β 1 privo di attività catalitica che mantiene la medesima localizzazione cellulare della sua controparte *wild type*.

Abbiamo scelto di mutagenizzare i residui corrispondenti alla His311 e His356 della PLC- δ 1 di ratto, che sono risultati essere nella PLC- β 1 le His331 e His378, come mostrato nella figura 9. Studi strutturali svolti sulla PLC- δ 1 cristallizzata hanno infatti identificato le His311 e His356 come i residui catalitici. In particolare durante l'idrolisi dei fosfoinositidi l'His311 insieme con il Ca^{2+} partecipa alla stabilizzazione dello stato di transizione che presenta numerose cariche negative, mentre l'His356 prende parte sia alla protonazione del diacilglicerolo che all'idrolisi dell'intermedio ciclico³³.

			311		
PLC_ δ 1	296	QDMDQPLSHYLVSSSH	NTYLLEDQLTGPSSTEAYIRALCKGCRCELD	CWDG--PNQEPIIYH	356
PLC_ β 1	316	EDMSQPLSHYFINSSH	NTYLTAGQLAGNSSVEMYRQVLLSGCR	VELDCWKGR	TAEEEPVITH 378
			331		
PLC_ δ 1	357	GYTFTSKILFCDVLR	AIRDYAFKASPPVILSLENHC-SLE	QQRVMARHLRAILGPILLDQPL	418
PLC_ β 1	379	GFTMTTEISFKEVIEAIAE	CAFKTSPFPILLSFENHVDSPKQQA	KMAEYCRLIFGDALLMEPL	441
PLC_ δ 1	419	D-----GVT	TSLSPEQLK	GKILLK	GK 440
PLC_ β 1	442	EKYPLESGV--	PLPSPMDL	MYKILV	KNK 467

Figura 9. Allineamento delle sequenze amminoacidiche dei domini X della PLC- δ 1 di ratto e della PLC- β 1 di ratto. I residui catalitici sono indicati in rosso. L'allineamento è stato effettuato utilizzando l'algoritmo EMBOSS Pairwise Alignment Algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>).

Per valutare l'attività catalitica del mutante H331A/H378A abbiamo effettuato un saggio di attività della fosfolipasi su lisati totali di cellule Cos-7 trasfettate con il vettore

Risultati

pRc/CMV vuoto (utilizzato come controllo negativo per valutare l'attività fosfolipasica basale delle cellule) oppure con i plasmidi codificanti per la PLC- β 1 *wild type*, per il doppio mutante della PLC- β 1 H331A/H378A e per il mutante privo del dominio X (denominato " $\Delta(X)$ "). Prima di svolgere il saggio di attività è stata valutata in ogni campione l'effettiva overespressione della PLC, mediante analisi western blot. Abbiamo scelto di utilizzare le cellule Cos-7 in quanto presentano un'espressione basale di PLC- β 1 molto ridotta ed inoltre mostrano un'elevata capacità di espressione del DNA esogeno.

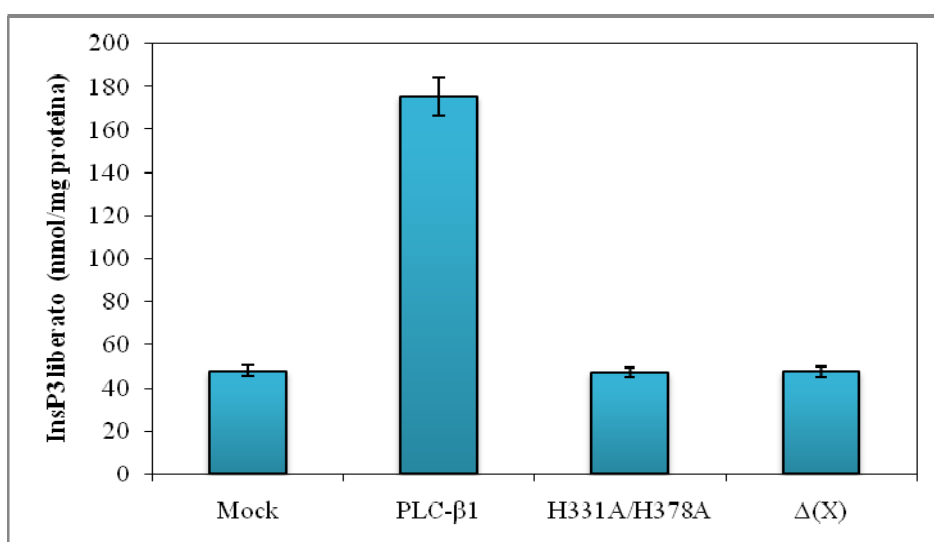


Figura 10. Effetti delle mutazioni H331A e H378A sull'attività catalitica della PLC- β 1. Il grafico mostra la misurazione dell'attività catalitica della PLC, utilizzando come substrato [3 H]PtdInsP $_2$, espressa come nmol di Ins(1,4,5)P $_3$ liberato / 30 minuti di incubazione per mg di lisato proteico. Il saggio di attività della PLC è stato effettuato su lisati totali di cellule Cos-7 trasfettate con un vettore vuoto (Mock) e vettori di espressione codificanti rispettivamente per: la PLC- β 1 *wild type*, il mutante della PLC- β 1(H331A/H378A), in cui gli aminoacidi H331 e H378 sono stati entrambi sostituiti con alanine, ed il mutante della PLC- β 1 privo del dominio X ($\Delta(X)$). I risultati mostrati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti \pm la deviazione standard, ogni campione è stato valutato in triplicato.

Il saggio di attività ha mostrato che la doppia mutazione (H331A e H378A) determina una perdita quasi totale dell'attività catalitica della PLC- β 1 (Fig. 10). Infatti l'attività enzimatica residua del mutante risulta essere paragonabile all'attività catalitica residua del

Risultati

mutante $\Delta(X)$, privo dell'intero dominio X. Il mutante $\Delta(X)$ è stato utilizzato come controllo negativo per l'attività catalitica della PLC in quanto la delezione di questa intera regione causa una perdita completa dell'attività enzimatica della fosfolipasi. Questi dati indicano dunque che l'effetto della mutazione dei residui del sito attivo His331 e His378 è paragonabile all'effetto della delezione del dominio X, mostrando dunque che abbiamo ottenuto una proteina cataliticamente inattiva.

3.2 Distribuzione cellulare del mutante cataliticamente inattivo nei mioblasti C2C12

Abbiamo paragonato la localizzazione cellulare della PLC- β 1 *wild type* con quella del suo mutante cataliticamente inattivo per determinare se le due mutazioni introdotte potessero influenzare la distribuzione subcellulare dell'enzima. Abbiamo analizzato la localizzazione nei mioblasti C2C12 delle proteine di fusione wtPLC- β 1-GFP e PLC- β 1(H331A/H378A)-GFP. La figura 11A mostra che la PLC- β 1 *wild type* risulta essere situata principalmente nel nucleo cellulare, con un basso segnale a livello citosolico. La figura 11B indica che la proteina mutata mantiene la medesima localizzazione cellulare della sua controparte *wild type*. Questi dati suggeriscono quindi che le due mutazioni introdotte non alterano la localizzazione cellulare della PLC- β 1 in quanto sia la proteina *wild type* che quella mutata vanno a localizzarsi preferenzialmente nel nucleo.

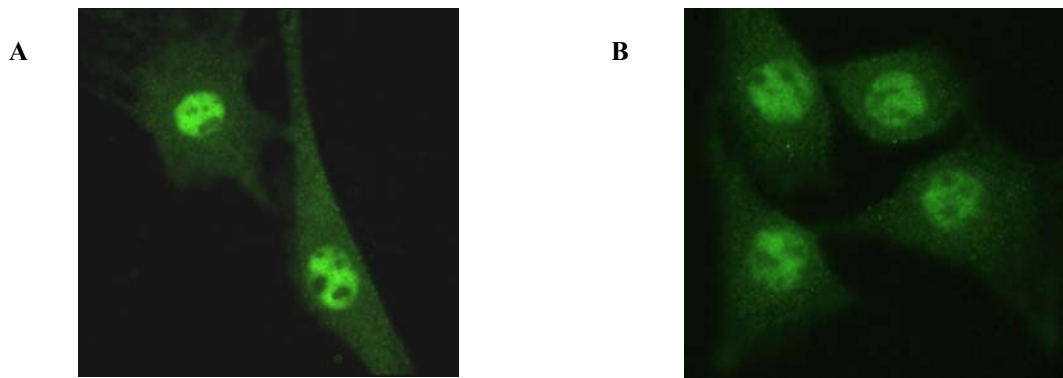


Figura 11. Localizzazione della proteina di fusione costituita dalla GFP e dalla PLC- β 1 *wild type* oppure dal mutante H331A/H378A. La localizzazione subcellulare dei due enzimi è stata valutata nei mioblasti murini C2C12 24 ore dopo la trasfezione. Il riquadro **A** mostra la distribuzione della proteina di fusione con la PLC- β 1 *wild type*, mentre il riquadro **B** indica la localizzazione della GFP fusa al mutante privo di attività catalitica.

3.3 Effetti del mutante privo di attività catalitica sull'espressione dei marcatori differenziamento miogenico

In uno studio condotto in precedenza abbiamo dimostrato attraverso il silenziamento della PLC- β 1 che la sua espressione è necessaria per la regolazione dei livelli di miogenina e di ciclina D3 durante il differenziamento miogenico⁶⁶.

Per studiare l'effetto esercitato dal mutante della PLC- β 1 privo di attività catalitica sul processo differenziativo, i mioblasti C2C12 sono stati trasfettati con i plasmidi codificanti per la PLC- β 1 *wild type* e per il mutante H331A/H378A della PLC- β 1. Le cellule sono state incubate per 48 ore in terreno di crescita (GM) o in terreno di differenziamento (DM) contenente insulina, quindi sono state lisate. Tramite western blot sono stati valutati i livelli di miogenina, un marcatore del differenziamento muscolare, e di ciclina D3. I risultati, come mostrato nella figura 12, indicano che l'overespressione del mutante privo di attività catalitica determina una minore induzione dell'espressione di miogenina e di ciclina D3 rispetto a quanto avviene in seguito all'overespressione della PLC- β 1 *wild type*. Questi dati suggeriscono che l'attività di trasduzione del segnale della PLC- β 1 svolge un ruolo importante nell'aumento dei livelli di ciclina D3 ed inoltre che l'attivazione di questa via sostiene il differenziamento dei mioblasti murini C2C12 in termini di espressione della miogenina.

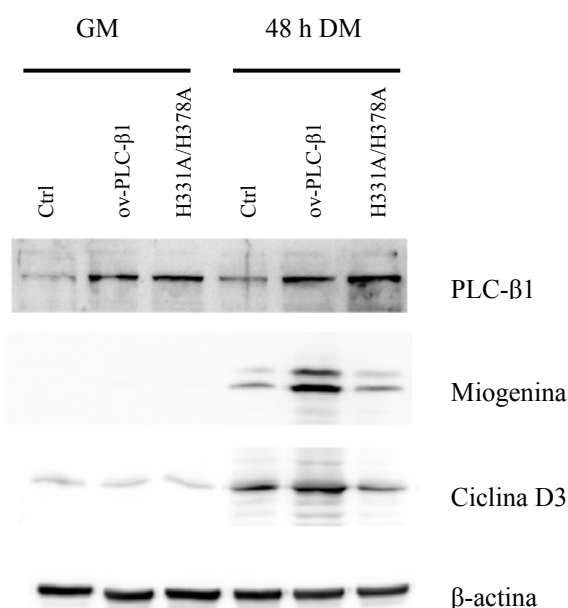


Figura 12. Effetti del mutante H331A/H378A sui livelli di espressione dei marcatori di differenziamento muscolare. Cellule C2C12 non trasfettate e mioblasti che overesprimono la PLC- β 1 *wild type* oppure il mutante H331A/H378A sono stati mantenuti in terreno di crescita (GM) e in terreno di differenziamento contenente insulina 100nM (DM) per 48 ore. 50 μ g di lisati totali di questi campioni sono stati separati su gel SDS-PAGE. Attraverso l'uso di anticorpi specifici è stata valutata l'espressione della PLC- β 1, della miogenina e della ciclina D3. Una della membrane è stata fatta incubare nuovamente con l'anticorpo anti β -actina per normalizzare la quantità di lisato caricata nelle diverse *lane*. I risultati mostrati appartengono ad un esperimento rappresentativo dei tre effettuati.

3.4 Effetti del mutante H331A/H378A sull'attivazione del promotore della ciclina D3

L'attività trascrizionale del promotore della ciclina D3 può essere indotta dall'espressione della PLC- β 1⁶⁶. In effetti l'aumento di espressione della PLC- β 1, che si osserva durante il differenziamento dei mioblasti in miotubi, causa l'attivazione di una regione specifica del promotore della ciclina D3, indicando che la PLC- β 1 svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del gene murino della ciclina D3. In particolare la PLC- β 1 risulta essere in grado di attivare la regione del promotore compresa tra -446 e -190 paia di basi, calcolate rispetto al sito di inizio della trascrizione.

Basandoci sui risultati ottenuti in precedenza, siamo andati a valutare la capacità del mutante H331A/H378A della PLC- β 1 di attivare il promotore della ciclina D3. In particolare, abbiamo effettuato il saggio del gene *reporter* utilizzando il plasmide pD3-957 che contiene il gene codificante per l'ormone della crescita umano (*human Growth Hormone*, hGH) posto sotto il controllo del frammento del promotore della ciclina D3 che va da -957 paia di basi al sito di inizio della trascrizione, contenente dunque la regione controllata dall'espressione della PLC- β 1.

I mioblasti C2C12 sono stati trasfettati in modo transiente con il plasmide pD3-957 e con i vettori codificanti per GFP, usato come controllo, per la PLC- β 1 *wild type* e per il mutante della PLC- β 1 H331A/H378A.

Come previsto, l'overespressione del mutante della PLC- β 1 H331A/H378A non ha causato l'attivazione del promotore della ciclina D3 nelle cellule proliferanti (Fig. 13). In seguito a trattamento con insulina, abbiamo rilevato una minor produzione di hGH da parte delle cellule che esprimono la proteina cataliticamente inattiva, non solo rispetto alla quantità prodotta dai mioblasti che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*, ma anche rispetto a quella prodotta dalle cellule di controllo.

Questi dati dimostrano quindi che l'attività catalitica della PLC- β 1 è necessaria per l'attivazione del promotore della ciclina D3 in risposta alla stimolazione con insulina e di conseguenza che la via di trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1 è coinvolta nel controllo della trascrizione del gene della ciclina D3.

Risultati

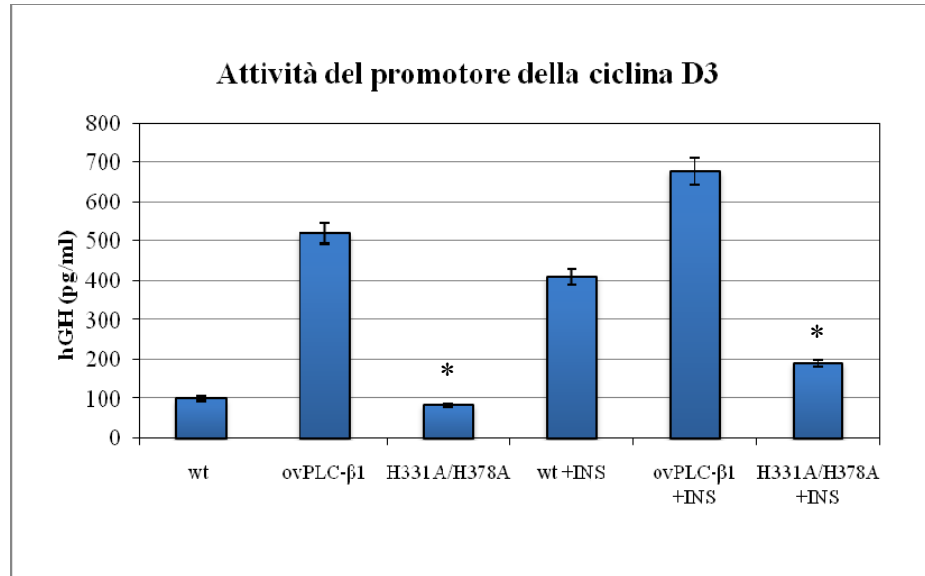


Figura 13. Effetti dell'espressione del mutante della PLC-β1 H331A/H378A sull'attivazione del promotore della ciclina D3. I mioblasti C2C12 sono stati co-trasfettati con il vettore pD3-957 e i plasmidi codificanti per GFP (wt), per la PLC-β1 *wild type* (ov-PLC-β1) o per il mutante della PLC-β1 privo di attività catalitica (H331A/H378A). Le cellule sono state stimolate per 24 ore con terreno di differenziamento, contenente insulina 100nM, dove indicato (+INS), quindi è stata misurata la produzione di hGH. L'attivazione del promotore della ciclina D3 è stata valutata attraverso la determinazione della quantità di hGH prodotto. I dati riportati costituiscono la media di tre replicati, la deviazione standard è indicata dalle barre di errore. L'asterisco (*) indica la significatività statistica (con $P < 0.001$ rispetto al campione corrispondente che overesprime la PLC-β1 *wild type*).

3.5 Analisi in *real-time* PCR dei livelli di espressione della ciclina D3

Al fine di confermare anche a livello trascrizionale i dati ottenuti attraverso l'analisi western blot e mediante il saggio del gene *reporter* sull'attivazione del promotore, siamo andati a valutare i livelli di espressione della ciclina D3 tramite *real-time* PCR.

Un'aliquota dei campioni utilizzati per il saggio del gene *reporter* è stata utilizzata per estrarne l'RNA totale, per la sintesi di cDNA mediante retro-trascrizione e per la reazione di *real-time* PCR.

Per valutare se le cellule utilizzate fossero state effettivamente trasfettate, siamo andati a misurare in primo luogo l'espressione della PLC- β 1 sia nelle cellule di controllo trasfettate con il vettore codificante per la GFP, che nei mioblasti trasfettati con i plasmidi codificanti per la PLC- β 1 *wild type* e per il suo mutante privo di attività catalitica. Abbiamo valutato l'espressione genica sia nelle cellule mantenute in terreno di crescita che cellule stimulate con insulina per 24 ore.

Come mostra la figura 14A, la PLC- β 1 risulta essere overespressa nelle cellule trasfettate ed inoltre è chiaramente visibile l'aumento dell'espressione della PLC- β 1 in tutti i campioni in risposta alla stimolazione con insulina.

Per quanto riguarda l'espressione della ciclina D3, nelle cellule proliferanti i suoi livelli risultano essere superiori nel campione che overesprime la PLC- β 1 *wild type* rispetto a quelli delle cellule di controllo, mentre i mioblasti che esprimono il mutante della PLC- β 1 privo di attività catalitica mostrano una riduzione dell'espressione di ciclina D3 (Fig. 14B). Dopo 24 ore di stimolazione con insulina, è possibile notare l'aumento dei livelli di ciclina D3 sia nel campione di controllo che nelle cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*, mentre le cellule trasfettate con il vettore codificante per il mutante cataliticamente inattivo hanno evidenziato un incremento minore dei livelli di ciclina D3. Inoltre l'espressione della ciclina D3 in questo campione risulta essere comunque inferiore rispetto a quella che si osserva nel campione di controllo. Ne consegue che l'espressione del mutante della PLC- β 1 privo di attività catalitica inibisce l'attivazione del promotore della ciclina D3 sia nelle cellule ciclianti che nei mioblasti in differenziamento.

Risultati

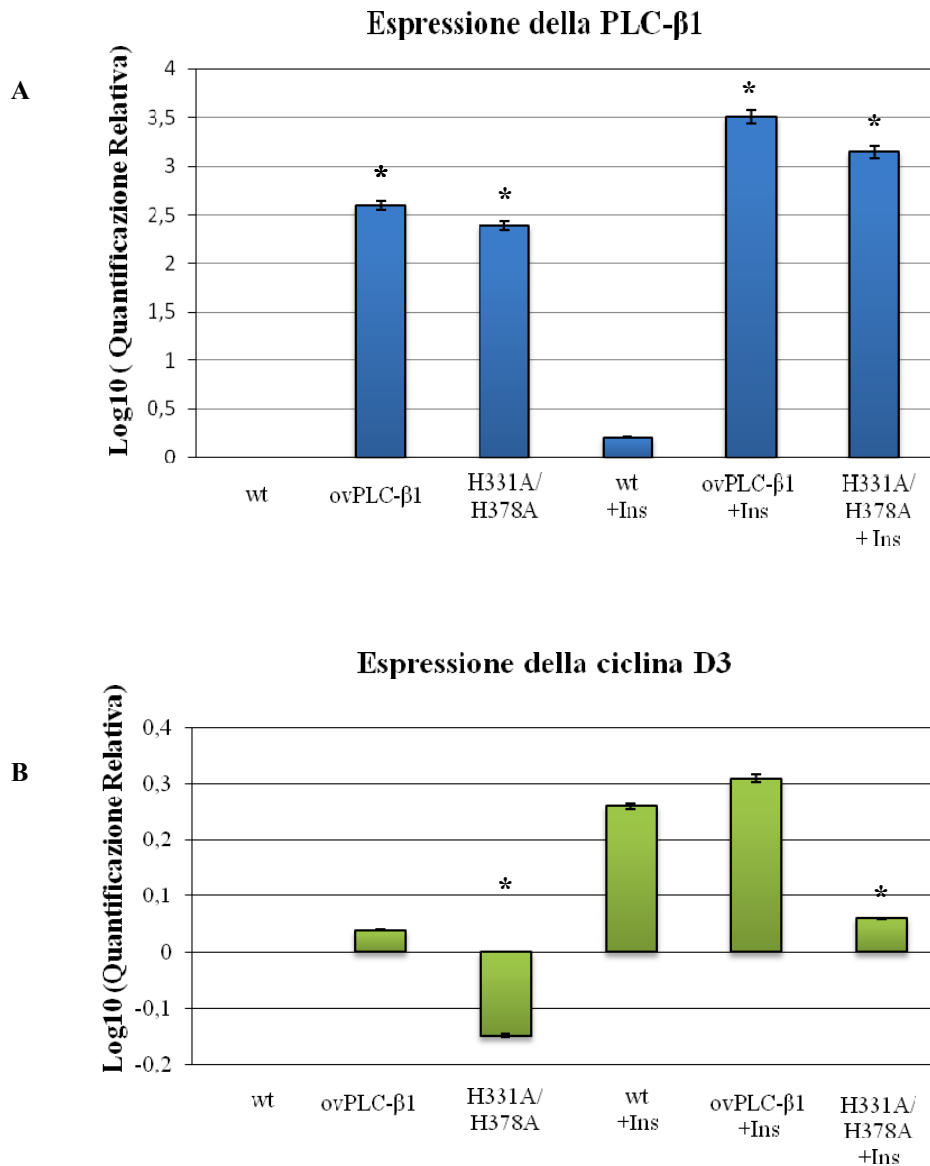


Figura 14. Effetti dell'espressione del mutante della PLC- β 1 H331A/H378A sull'espressione del gene della ciclina D3. I livelli di espressione della PLC- β 1 e della ciclina D3 sono stati valutati attraverso *real-time* PCR su C2C12 trasfettate con plasmidi codificanti per GFP (wt), per la PLC- β 1 *wild type* (ov-PLC- β 1) e per il mutante della PLC- β 1 privo di attività catalitica (H331A/H378A). Dove indicato le cellule sono state stimulate con insulina 100nM per 24 ore (+Ins). Riquadro **A**: quantificazione relativa dell'espressione della PLC- β 1. Riquadro **B**: quantificazione relativa dell'espressione della ciclina D3. In entrambi i riquadri è stato utilizzato come campione di riferimento l'RNA estratto dalle cellule trasfettate con GFP e non stimulate con insulina. I dati riportati rappresentano le medie di tre misurazioni, la deviazione standard è indicata dalle barre di errore. L'asterisco (*) indica la significatività statistica (con $P < 0.001$ rispetto al campione wt nel riquadro A, mentre nel riquadro B rispetto al campione corrispondente che overesprime la PLC- β 1 *wild type*).

3.6 Profilo di espressione genica dei mioblasti C2C12 stimolati con insulina

Per identificare le vie di trasduzione del segnale la cui attivazione dipende dall'attività di trasduzione della PLC- β 1, siamo andati ad analizzare l'espressione di 84 geni rappresentativi di 18 diverse vie di trasduzione del segnale utilizzando i PCR *array*. In particolare, abbiamo paragonato il profilo di espressione genica di mioblasti C2C12 che esprimono il mutante della PLC- β 1 privo di attività catalitica con quello di C2C12 che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*, entrambi indotti a differenziare attraverso 24 ore di stimolazione con insulina.

Questa analisi ha reso possibile evidenziare che l'espressione di un grande numero di geni viene ridotta durante il differenziamento miogenico nel campione che esprime il mutante cataliticamente inattivo rispetto al campione che overesprime la PLC- β 1 *wild type*. In particolare sono risultati essere interessati diversi geni appartenenti alla via di NF- κ B, alla via di risposta allo stress e alla via di Hedgehog. Infine il gene la cui espressione è risultata essere maggiormente ridotta in seguito all'espressione del mutante H331A/H378A è c-jun, che prende parte a numerose vie di trasduzione del segnale (tabella 1). Questi dati quindi indicano che durante il differenziamento miogenico il segnale generato dalla PLC- β 1 viene propagato attraverso la regolazione del fattore di trascrizione c-jun che partecipa alla formazione del complesso AP-1.

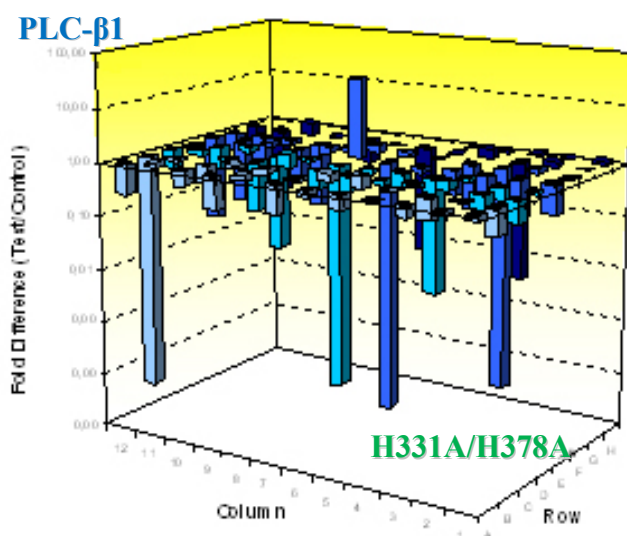


Figura 15. Variazione dell'espressione genica in risposta all'insulina in seguito all'espressione del mutante H331A/H378A. Il grafico mostra la variazione di espressione di ogni gene analizzato nelle cellule che overesprimono il mutante H331A/H378A rispetto alle cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*, stimolate con insulina 100nM per 24 ore. Le colonne rivolte verso l'alto, con valore dell'asse $z > 1$, indicano un aumento dell'espressione genica, mentre le colonne rivolte verso il basso, con valore dell'asse $z < 1$ indicano una riduzione dell'espressione del gene.

Risultati

Gene	Fold difference H331A/H378A vs PLC-β1	Gene	Fold difference H331A/H378A vs PLC-β1	Gene	Fold difference H331A/H378A vs PLC-β1
Birc3	-3,34	Hsf1	-14362,31	Mmp7	-35,02
Bmp2	-3,97	Icam1	-52,71	Nfkbia	-11585,24
Ccl2	-3,89	Igfbp4	-2,5	Nos2	-6,32
Ccl20	-3,2	Il1a	-3,46	Ptgs2	-15,14
Cd5	-2,46	Il2	-3,76	Sele	-2,85
Cebpb	-2,17	Il2ra	-2,17	Selp	-2,14
Cxcl1	-22073,07	Il4ra	-2,64	Tert	-148,06
Cxcl9	-2,68	Jun	-42938,97	Tnf	-85,04
Fgf4	-7,52	Lef1	29,45	Vcam1	-2,28
Foxa2	-2,01	Lta	-3,03	Wnt1	-13,55
Hhip	-116,97	Mmp10	-12,55	Wnt2	-2,69

= via di Hodgehog
 = via di risposta allo stress
 = via di NF-kB

Tabella 1. Geni che subiscono una variazione di espressione in seguito all'espressione del mutante cataliticamente inattivo. La tabella raggruppa i geni la cui espressione risulta essere alterata dall'overespressione del mutante H331A/H378A rispetto al campione che overesprime la PLC-β1 *wild type*. E' riportata l'entità del cambiamento, il segno negativo indica una riduzione dell'espressione del gene. Sono indicate le vie di pertinenza dei geni maggiormente influenzati.

3.7 Attivazione di NF- κ B durante il differenziamento miogenico

Per confermare i dati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica, abbiamo quindi effettuato dei saggi EMSA utilizzando una sonda specifica per NF- κ B. Siamo andati a valutare la capacità di legare questa sonda da parte dei fattori di trascrizione presenti in diversi estratti nucleari di mioblasti C2C12 stimolati a differenziare. In particolare 24 ore dopo averne indotto il differenziamento, abbiamo lisato cellule che overesprimevano la PLC- β 1 *wild type* o il suo mutante privo di attività catalitica. Come terreno di differenziamento è stato utilizzato sia DMEM senza siero contenente insulina 100nM che DMEM contenente il 2% di FBS.

Come mostra la figura 16, è possibile notare la presenza di una pronunciata attività di legame nelle cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type* stimolate con insulina, mentre questa capacità di legame non si riscontra nelle cellule che overesprimono il mutante H331A/H378A. Questa differenza è risultata essere meno marcata nei mioblasti in cui il differenziamento è stato indotto dalla deprivazione di siero, suggerendo la possibilità che questo tipo di stimolazione vada ad attivare vie di trasduzione del segnale diverse da quelle indotte dall'insulina.

Nell'insieme i dati così ottenuti supportano i risultati conseguiti con i PCR *array*.

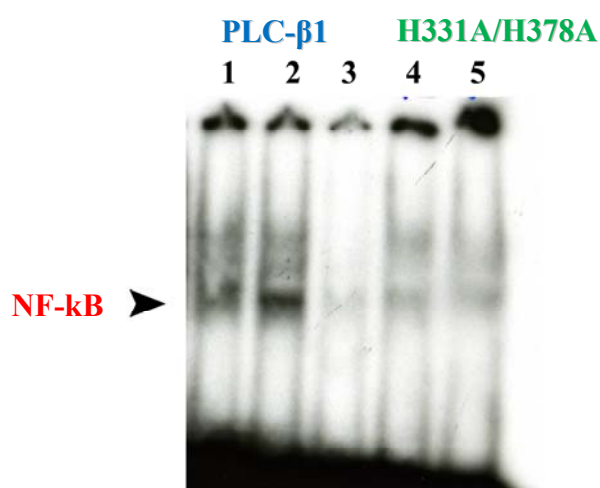


Figura 16. NF- κ B viene attivato nel differenziamento dei mioblasti C2C12. L'EMSA mostra l'attivazione di NF- κ B 24 ore dopo l'induzione del processo differenziativo.

Lane 1: estratto nucleare di cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*, differenziate in DMEM contenente il 2% di siero. *Lane 2:* estratto nucleare di cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*, differenziate con somministrazione di insulina 100nM. *Lane 3:* pre-incubazione dell'estratto nucleare di cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type* con la sonda di NF- κ B non marcata. *Lane 4:* estratto nucleare di cellule che overesprimono il mutante H331A/H378A, differenziate in DMEM contenente il 2% di siero. *Lane 5:* estratto nucleare di cellule che overesprimono il mutante H331A/H378A, differenziate con insulina 100nM. L'EMSA della figura mostra un esperimento rappresentativo dei tre effettuati.

3.8 La trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1 attiva c-jun nel differenziamento miogenico

Come già riportato, la PLC- β 1 può attivare una specifica regione del promotore della ciclina D3, ovvero la regione che comprende il frammento che spazia da -446 a -190 paia di basi rispetto al sito di inizio della trascrizione⁶⁶. Abbiamo utilizzato il programma Alibaba 2.1 per analizzare questa regione del promotore con lo scopo di individuare la presenza di siti di legame putativi per fattori di trascrizione. Come indicato nella figura 17, questo frammento del promotore della ciclina D3 contiene i siti consenso per numerosi fattori di trascrizione, tra i quali è presente anche c-jun. Questo fattore è risultato essere il gene maggiormente down-regolato durante il differenziamento miogenico nelle cellule che overesprimono il mutante cataliticamente inattivo della PLC- β 1 rispetto alle cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*.

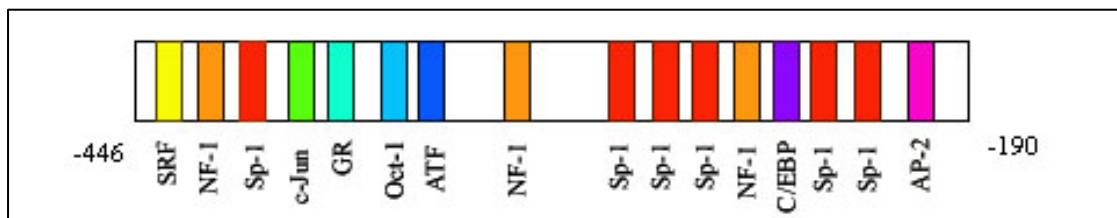


Figura 17. Rappresentazione schematica del frammento del promotore della ciclina D3 comprendente la regione tra -446 e -190 paia di basi, sono indicati i siti consenso per i fattori di trascrizione.

c-jun è uno dei fattori di trascrizione che partecipa alla formazione del complesso AP-1. Questo complesso è un dimero costituito dall'associazione di membri della famiglia Jun con fattori appartenenti alla famiglia Fos oppure con un gruppo di proteine ATF⁹¹.

Per chiarire se l'attivazione di AP-1 fosse influenzata dall'attivazione di vie di trasduzione del segnale dipendenti dalla PLC- β 1 abbiamo effettuato un saggio EMSA utilizzando una sonda specifica per AP-1.

Risultati

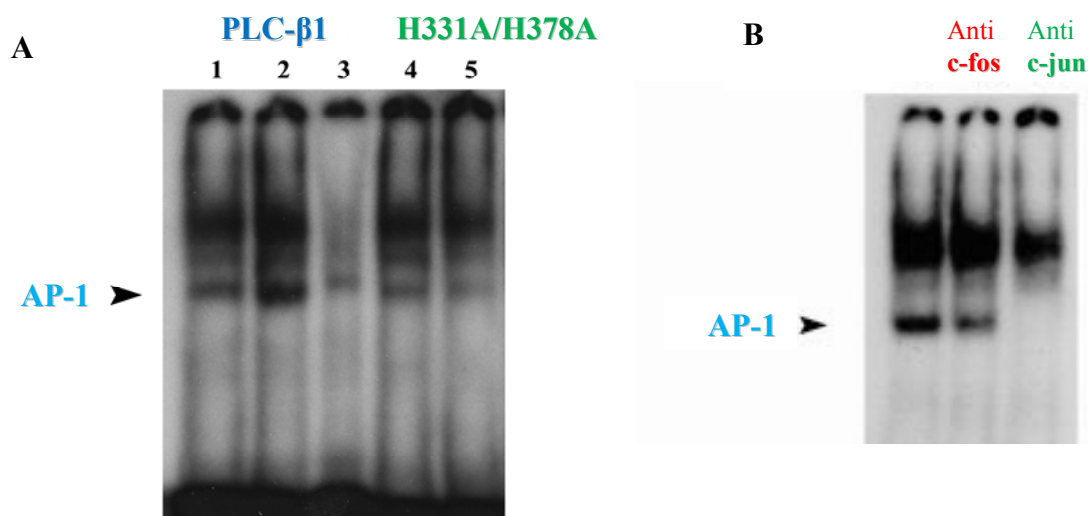


Figura 18. L'attivazione di c-jun nel differenziamento miogenico necessita dell'attività catalitica della PLC-β1. Riquadro A: L'EMSA mostra l'attivazione di AP-1 a 24 ore dallo stimolo differenziativo. *Lane 1*: estratto nucleare di C2C12 che overesprimono la PLC-β1 *wild type*, differenziate in DMEM contenente il 2% di siero. *Lane 2*: estratto nucleare di C2C12 che overesprimono la PLC-β1 *wild type*, differenziate con insulina 100nM. *Lane 3*: estratto nucleare di C2C12 che overesprimono la PLC-β1 *wild type* incubate con un eccesso di sonda non marcata (lane di controllo della specificità della sonda). *Lane 4*: estratto nucleare di C2C12 che overesprimono il mutante H331A/H378A, differenziate in DMEM contenente il 2% di siero. *Lane 5*: estratto nucleare di C2C12 che overesprimono il mutante H331A/H378A, differenziate con insulina 100nM. Riquadro B: Per identificare il fattore che lega la sonda, gli estratti nucleari di C2C12 che overesprimono la PLC-β1 *wild type*, stimulate con insulina 100nM, sono stati incubati con anticorpi anti c-fos e anti-c-jun. **Ctrl**: estratto nucleare non incubato con anticorpi. L'anticorpo anti-c-jun ha impedito il legame tra la sonda e il fattore di trascrizione, come indica la scomparsa della banda.

Come è possibile notare nella figura 18A, le cellule che overesprimono la PLC-β1 mostrano un'attivazione marcata di AP-1 24 ore dopo la stimolazione con insulina, mentre le cellule che overesprimono il mutante privo di attività catalitica presentano un livello di attivazione di AP-1 molto inferiore.

Al fine di verificare se c-jun fosse effettivamente coinvolto nella formazione del dimero AP-1 e quindi nel legame della sonda, abbiamo ripetuto il saggio EMSA utilizzando gli anticorpi anti-c-fos (utilizzato come controllo negativo) ed anti-c-jun. Questi anticorpi sono stati fatti incubare, prima dell'aggiunta della sonda marcata, con gli estratti nucleari di cellule C2C12 overesprimenti la PLC-β1 *wild type* che erano state stimulate con insulina. Abbiamo scelto di utilizzare gli estratti nucleari di queste cellule in quanto queste condizioni rappresentano il momento in cui l'attivazione di AP-1 è risultata essere

Risultati

maggiormente evidente. La figura 18B mostra che l'interazione tra la sonda e il fattore, e quindi la banda corrispondente, non è più visibile in seguito all'incubazione dell'estratto con l'anticorpo anti-c-jun, indicando che è questo il fattore che interagisce con la sonda. Infatti il legame con l'anticorpo ha determinato il mascheramento del sito di legame della proteina con la sua sequenza consenso causandone la mancata interazione. Questi risultati suggeriscono che è c-jun il fattore di trascrizione che viene attivato nel differenziamento miogenico nelle cellule che overesprimono la PLC- β 1 *wild type* e che quindi potrebbe essere il responsabile dell'attivazione del promotore della ciclina D3.

3.9 Effetti della mutazione del sito consenso di c-jun sull'attivazione PLC- β 1-dipendente del promotore della ciclina D3

Abbiamo effettuato una serie di esperimenti volti a determinare se c-jun fosse un regolatore importante della trascrizione della ciclina D3 durante il differenziamento miogenico. Abbiamo così disegnato una sonda di 40 paia di basi, utilizzando il frammento del promotore della ciclina D3 che spazia da -424 a -385 paia di basi, comprendente il sito consenso per c-jun. Abbiamo poi progettato, sulla medesima regione del promotore, una seconda sonda contenente però tre basi mutate a livello del sito di legame putativo di c-jun.

Siamo quindi andati ad effettuare dei saggi EMSA utilizzando gli estratti nucleari di mioblasti C2C12 che overesprimevano la PLC- β 1 *wild type*, indotti a differenziare attraverso 24 ore di stimolazione con insulina.

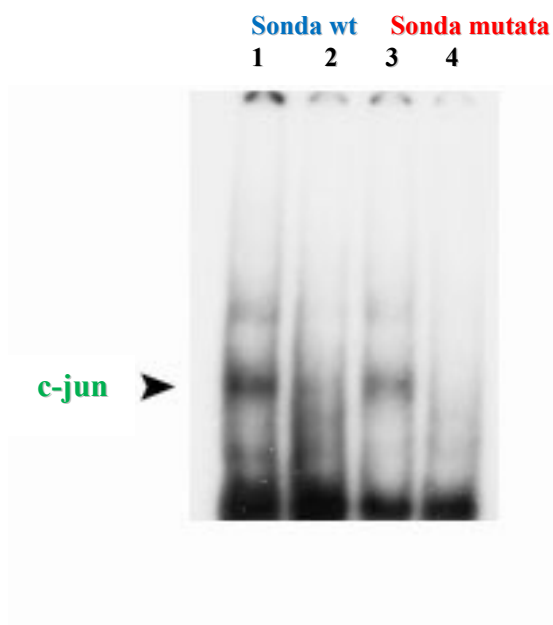


Figura 19. Determinazione della capacità di c-jun di legare il frammento -424/-385 del promotore della ciclina D3.

L'EMSA è stato effettuato su estratti nucleari di mioblasti che overesprimono la PLC- β 1 *wild type*, indotti a differenziare con insulina 100nM. *Lane 1*: la sonda utilizzata corrisponde al frammento -424/-385 del promotore della ciclina D3. *Lane 3*: la sonda utilizzata è il frammento -424/-385 del promotore della ciclina D3 mutato nel sito consenso per c-jun. La specificità dell'interazione è stata verificata tramite l'utilizzo della sonda corrispondente non marcata (*lane 2 e lane 4*). I risultati riportati sono relativi ad un esperimento rappresentativo dei tre effettuati.

I risultati riportati nella figura 19 indicano la presenza di una pronunciata attività di legame diretta verso la sonda disegnata sul promotore, mentre la sonda mutata viene legata in maniera molto inferiore. La presenza di una frazione legata anche nella *lane* relativa alla

Risultati

sonda mutata potrebbe essere spiegata dalla presenza di siti consenso per il recettore degli estrogeni e per il recettore dei glucorticoidi nella regione del promotore adiacente al sito consenso di c-jun. Questi siti, in virtù della loro prossimità al sito di legame di c-jun, sono stati inclusi nella sonda ma non sono stati alterati dalla mutazione del sito di riconoscimento di c-jun.

Per confermare l'importanza dell'attivazione c-jun nell'induzione dell'attività trascrizionale del promotore della ciclina D3, abbiamo effettuato il saggio del gene *reporter* utilizzando una versione del plasmide pD3-957 in cui il sito consenso di c-jun è stato mutato (pD3-957mut). Come già riportato in precedenza, il vettore pD3-957 contiene il frammento del promotore della ciclina D3 la cui attivazione è risultata essere influenzata dalla trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1. Abbiamo quindi co-trasfettato i mioblasti C2C12 con i plasmidi codificanti per GFP (come controllo negativo) oppure per la PLC- β 1 *wild type* e con il vettore pD3-957 nativo oppure con la sua controparte mutata pD3-957mut. Siamo poi andati a valutare la produzione di hGH nei diversi campioni 24 ore dopo l'induzione del processo differenziativo. E' stato utilizzato come stimolo di differenziamento sia la deprivazione di siero che la somministrazione di insulina.

Come mostrato dalla figura 20, il promotore mutato non viene più attivato né dalla sola overespressione della PLC- β 1 né dalla stimolazione con insulina, mentre le cellule trasfettate con il vettore pD3-957 hanno evidenziato la produzione di hGH attesa. Nel complesso questi dati sottolineano che il legame di c-jun al promotore della ciclina D3 risulta essere essenziale per la sua attivazione in risposta alla segnalazione lungo la via di trasduzione dipendente dalla PLC- β 1.

Risultati

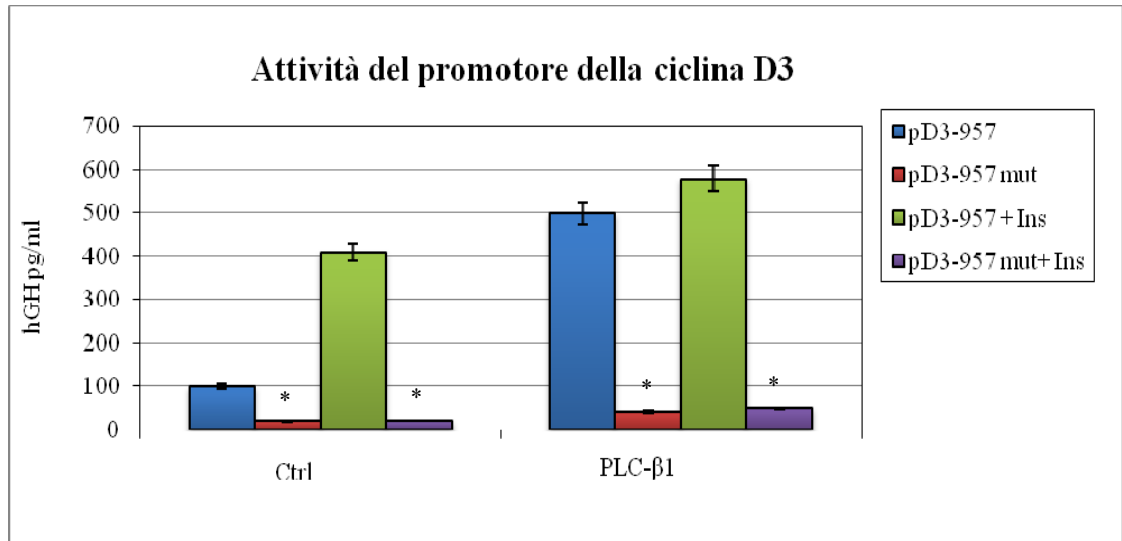


Figura 20. La mutazione del sito consenso di c-jun compromette l'attivazione del promotore della ciclina D3 mediata dalla PLC-β1. Le cellule C2C12 sono state co-trasfettate con i plasmidi codificanti per la GFP (Ctrl) o per la PLC-β1 *wild type* (PLC-β1) e con il vettore pD3-957 nativo oppure con la sua versione mutata nel sito consenso per c-jun (pD3-957mut). Le cellule sono state stimolate per 24 ore con terreno di differenziamento, contenente insulina 100nM dove indicato, ed è stata valutata la produzione di hGH. L'attività del promotore della ciclina D3 è stata determinata in base alla misurazione dell'hGH prodotto. I dati riportati rappresentano la media di tre misurazioni, con la deviazione standard indicata dalle barre di errore. L'asterisco (*) indica la significatività statistica con $P < 0.001$ rispetto al campione corrispondente trasfettato con il vettore contenente il promotore non mutato.

3.10 IPMK: un possibile mediatore della via attivata dalla PLC- β 1 nel differenziamento miogenico

E' stato dimostrato che l'inositolo-fosfato multi chinasi (*Inositol-Phosphate Multi Kinase*, IPMK) si localizza prevalentemente a livello nucleare, dove partecipa al metabolismo dei fosfoinositidi. Abbiamo ipotizzato che questo enzima potesse rappresentare un mediatore della via di trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1.

Innanzitutto per comprenderne meglio la distribuzione cellulare nei mioblasti C2C12, abbiamo costruito una proteina di fusione costituita dalla GFP e dall'IPMK, che, come mostrato nella figura 21, è risultata presentare una localizzazione esclusivamente nucleare.

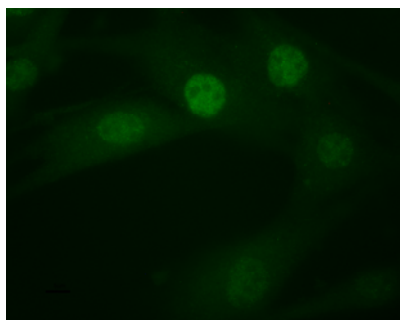


Figura 21. Localizzazione nucleare dell'IPMK. La distribuzione cellulare dell'IPMK è stata determinata 24 ore dopo la trasfezione transiente dei mioblasti C2C12 con un costrutto codificante per la proteina di fusione GFP-IPMK.

Al fine di verificare quindi se l'IPMK fosse coinvolto nella via di trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1, siamo andati a valutare la capacità dell'IPMK di attivare il promotore della ciclina D3 effettuando il saggio del gene *reporter*, con produzione di hGH. I mioblasti C2C12 sono stati co-trasfettati con il vettore codificante per l'IPMK e con il vettore pD3-957 nativo oppure con la sua controparte che presenta il sito consenso per c-jun mutato (pD3-957mut). Come controllo sono stati utilizzati mioblasti co-trasfettati con un plasmide codificante per GFP e con le due versioni del vettore pD3-957. Abbiamo misurato la produzione di hGH 24 ore dopo l'induzione del differenziamento attraverso deprivazione di siero o somministrazione di insulina 100nM.

Abbiamo così notato che l'overespressione dell'IPMK è capace di indurre la produzione di hGH e quindi di attivare il medesimo frammento del promotore della ciclina D3 che è risultato essere attivato dalla via di trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1. Inoltre le cellule trasfettate con il vettore pD3-957mut, recante il sito consenso di c-jun

Risultati

mutato, hanno mostrato una grossa riduzione nella produzione di hGH anche in seguito a stimolazione con insulina (Fig. 22).

Nel loro insieme questi dati suggeriscono che l'IPMK possa effettivamente essere un mediatore della via di trasduzione del segnale della PLC- β 1.

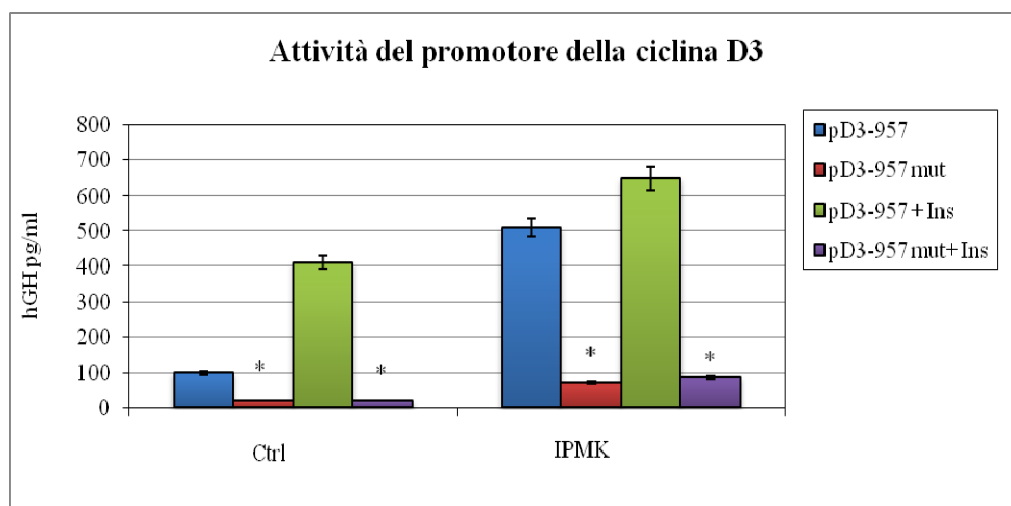


Figura 22. L'attivazione del promotore della ciclina D3 indotta dall'overespressione dell'IPMK è mediata da c-jun. Il saggio di attivazione del promotore della ciclina D3 è stato effettuato su mioblasti C2C12 co-trasfettati con i plasmidi codificanti per GFP (Ctrl) o per l'IPMK e con il vettore pD3-957 nativo oppure con la sua versione mutata nel sito consenso di c-jun (pD3-957mut). Le cellule sono state stimolate per 24 ore con terreno di differenziamento, contenente insulina 100nM dove indicato, ed è stata valutata la produzione di hGH. L'attività del promotore della ciclina D3 è stata determinata attraverso la misurazione dell'hGH prodotto. I dati riportati rappresentano la media di tre misurazioni, con la deviazione standard indicata dalle barre di errore. L'asterisco (*) indica la significatività statistica con $P < 0.001$ rispetto al campione corrispondente trasfettato con il vettore contenente il promotore non mutato.

DISCUSSIONE

Discussione

In uno studio condotto in precedenza abbiamo dimostrato che l'espressione della PLC- β 1 a livello nucleare è indispensabile per l'induzione del processo di differenziamento miogenico, in risposta alla stimolazione con insulina. Abbiamo infatti documentato che il silenziamento del gene codificante per la PLC- β 1 determina nei mioblasti murini l'inibizione della progressione del programma di differenziamento con conseguente mancato aumento dell'espressione dei marcatori di questo processo, quali la miogenina e la ciclina D3.

Per quanto riguarda la distribuzione dell'enzima, nelle cellule C2C12 la PLC- β 1 si accumula nel nucleo sia nei mioblasti ciclianti che nei miotubi differenziati multinucleati⁶⁶. Esperimenti effettuati utilizzando un mutante della PLC- β 1 che va a localizzarsi esclusivamente a livello citosolico, ci hanno permesso di dimostrare che non solo l'espressione della PLC- β 1 è fondamentale per il processo differenziativo, ma anche che è necessario che l'enzima mantenga la sua distribuzione fisiologica al nucleo. Infatti l'espressione di questo mutante citosolico ha causato l'inibizione dell'induzione del processo di differenziamento⁶⁶.

Nel loro insieme questi dati ci hanno fatto ipotizzare che gli effetti determinati dell'aumento dell'espressione della PLC- β 1, riscontrato durante il differenziamento miogenico, potessero dipendere dalla presenza dell'enzima nel nucleo piuttosto che dalla sua attività catalitica. In altre parole, abbiamo ipotizzato che l'importanza della PLC- β 1 in questo processo potesse risiedere nella capacità dell'enzima di interagire con diversi fattori, ad esempio come proteina "scaffold", piuttosto che nella sua attività di trasduzione del segnale.

Studi condotti sulla PLC- γ 1 avevano infatti dimostrato che l'importanza di questo enzima a livello nucleare non era dovuta alla sua capacità di idrolizzare i fosfolipidi ma piuttosto a quella di agire da fattore di scambio per il GTP per la proteina PIKE, che a sua volta va a stimolare l'attività della PI-3 chinasi⁹².

Uno degli obiettivi di questo studio era dunque quello di determinare l'importanza dell'attività catalitica della PLC- β 1 per l'induzione del differenziamento miogenico. Con questo scopo abbiamo mutagenizzato la sequenza della PLC- β 1 in modo da ottenere un mutante privo di attività enzimatica. Per la scelta degli aminoacidi bersaglio ci siamo basati su una serie di lavori condotti da diversi gruppi sulla PLC- δ 1 e sulla PLC- γ 1 di ratto. Nel loro insieme questi studi hanno permesso di identificare i residui His311 e

Discussione

His356 della PLC- δ 1 di ratto come gli aminoacidi che costituiscono il sito attivo della fosfolipasi. La sostituzione di questi aminoacidi infatti causa la perdita totale dell'attività catalitica dell'enzima^{33, 39, 44, 45}. Inoltre uno studio di mutagenesi condotto sulla PLC- γ 1 di ratto ha mostrato che la sostituzione in questa isoforma degli aminoacidi corrispondenti, ovvero l'His335 e l'His380, determina una marcata riduzione dell'attività enzimatica anche nella PLC- γ 1⁹³. Effettivamente il confronto delle sequenze aminoacidiche delle PLC di diversi organismi ha evidenziato che i domini X ed Y, che costituiscono il dominio catalitico, rappresentano le regioni che mostrano la maggiore omologia di sequenza, suggerendo quindi che alcuni degli aminoacidi conservati potrebbero essere fondamentali per l'attività catalitica dell'enzima^{26, 29, 30}.

Considerando dunque i risultati ottenuti in questi studi, abbiamo scelto di mutagenizzare nella PLC- β 1 le istidine corrispondenti ai residui catalitici della PLC- δ 1, che fanno parte dei residui conservati tra le due isoforme. In particolare abbiamo individuato come aminoacidi bersaglio, per ottenere un mutante della PLC- β 1 cataliticamente inattivo, le istidine presenti in posizione 331 e 378. Il nostro lavoro dimostra che effettivamente queste due istidine, localizzate entrambe nel dominio X, sono essenziali per il processo catalitico in quanto la loro sostituzione con alanine ha determinato una marcata riduzione dell'attività catalitica dell'enzima.

Come già riportato la localizzazione cellulare della PLC- β 1 è risultata essere fondamentale per la progressione del processo differenziativo, rendendo dunque necessaria la valutazione della distribuzione cellulare del mutante privo di attività catalitica, prima di poterlo utilizzare per gli studi successivi. I nostri esperimenti di localizzazione cellulare hanno dimostrato che la doppia mutazione a carico degli aminoacidi del sito attivo della PLC- β 1 non va ad alterare la normale localizzazione nucleare dell'enzima. Abbiamo quindi potuto dedurre che la distribuzione cellulare della PLC- β 1 non dipende dalla sua attività enzimatica.

La disponibilità di una proteina cataliticamente inattiva ha reso possibile effettuare una serie di esperimenti volti a chiarificare l'importanza della via di trasduzione del segnale dipendente dalla PLC- β 1 in alcuni degli eventi nucleari che caratterizzano il differenziamento miogenico.

In primo luogo abbiamo potuto dimostrare che è l'attività catalitica della PLC- β 1 a ricoprire un ruolo essenziale nel processo di differenziamento miogenico, come mostrato

Discussione

dal mancato aumento di miogenina e di ciclina D3, caratteristico delle prime fasi del processo differenziativo, in risposta alla stimolazione con insulina nei mioblasti che esprimono la proteina mutante cataliticamente inattiva.

Abbiamo quindi focalizzato la nostra attenzione nell'individuare i meccanismi molecolari che mediano la regolazione da parte della PLC- β 1 del gene codificante per la ciclina D3.

In precedenza abbiamo dimostrato che questa proteina rappresenta uno dei geni bersaglio della PLC- β 1 nel differenziamento miogenico⁶⁶. In particolare è stato identificato il frammento del promotore della ciclina D3 la cui attivazione risulta essere influenzata dai livelli di espressione della PLC- β 1, ovvero la regione corrispondente al frammento del promotore compreso tra -446 e -190 paia di basi, considerando come +1 il sito di inizio della trascrizione.

In questo lavoro abbiamo invece descritto come l'attivazione del promotore della ciclina D3, e quindi la trascrizione di questo gene, risulti essere dipendente dall'attività catalitica della PLC- β 1. I dati ottenuti risultano quindi supportare l'ipotesi che per la regolazione dell'espressione della miogenina e della ciclina D3 da parte della PLC- β 1, sono fondamentali sia l'attività catalitica di trasduzione del segnale che la localizzazione nucleare dell'enzima. Inoltre queste osservazioni sottolineano ulteriormente che il differenziamento miogenico rappresenta un processo finemente regolato che prevede l'interazione di numerosi fattori.

Abbiamo quindi cercato di identificare i meccanismi molecolari che consentono alla PLC- β 1 di attivare il promotore della ciclina D3 in risposta allo stimolo differenziativo. L'analisi del frammento del promotore della ciclina D3 attivato dalla PLC- β 1, volta ad individuare la presenza di siti di legame per fattori di trascrizione, ha portato all'identificazione di numerosi siti consenso per diversi fattori di trascrizione noti.

I nostri esperimenti di *profiling* dell'espressione genica ci hanno poi indicato c-jun come il fattore potenzialmente coinvolto nell'attivazione del promotore in modo dipendente dalla via di segnalazione attivata dalla PLC- β 1. Inoltre i saggi EMSA effettuati utilizzando la sonda per AP-1 hanno evidenziato che l'attività di legame di questo complesso di trascrizione risulta essere aumentata in risposta alla stimolazione con insulina nelle cellule che overesprimono la PLC- β 1. Al contrario l'espressione del mutante della PLC- β 1 privo di attività catalitica ha causato una marcata riduzione dell'attivazione di AP-1.

Il complesso di trascrizione AP-1 è un dimero costituito dall'associazione di proteine della famiglia Jun (c-Jun, JunB e JunD) e della famiglia Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2), ma

può anche prendere parte al complesso un gruppo di proteine ATF. E' stato dimostrato che la composizione di AP-1 nei mioblasti cambia nel passaggio dalla fase proliferativa a quella differenziativa, rispecchiando così i cambiamenti nell'attivazione dei geni bersaglio di AP-1 durante il processo di differenziamento.

In particolare, è stato dimostrato che c-jun prende parte ai complessi trascrizionali presenti nei mioblasti in differenziamento⁹¹. Inoltre è stato visto che il controllo trascrizionale del promotore di c-jun durante il differenziamento miogenico risulta essere svolto, almeno in parte, da complessi trascrizionali muscolo-specifici.

I risultati ottenuti dai saggi EMSA, effettuati utilizzando come sonde sia un frammento del promotore della ciclina D3 che la sua controparte mutata nel sito consenso per c-jun, dimostrano che nel lisato nucleare di mioblasti in differenziamento è effettivamente presente un fattore di trascrizione che viene attivato in risposta alla stimolazione con insulina. Questo fattore è risultato essere in grado di legare questa regione del promotore della ciclina D3 ma la sua capacità di legame viene persa in seguito alla mutazione del sito consenso di c-jun. Inoltre gli esperimenti volti a valutare l'attività del promotore della ciclina D3 mediante l'utilizzo di plasmidi codificanti per un gene *reporter* hanno evidenziato che l'eliminazione del sito di legame per c-jun determina una marcata riduzione dell'attività del promotore della ciclina D3 sia in risposta all'overespressione della PLC-β1 che in risposta alla stimolazione con insulina. Nell'insieme questi dati hanno evidenziato che l'attività catalitica della PLC-β1 influenza l'attivazione del promotore della ciclina D3 modulando la capacità di legame di c-jun.

Abbiamo quindi ipotizzato che il *pool* nucleare di Ins(1,4,5)P₃ possa costituire nel nostro modello l'elemento centrale nel controllo del processo di differenziamento miogenico da parte della PLC-β1, in termini di espressione di miogenina e di ciclina D3. Abbiamo inoltre fornito prove che l'attivazione del promotore della ciclina D3 da parte di c-jun può essere indotta anche dall'overespressione dell'Ipmk.

L'Ipmk è una chinasi che nelle cellule di mammifero presenta una localizzazione quasi esclusivamente nucleare e che quindi risulta essere coinvolta nel metabolismo dei fosfoinositidi in questo compartimento. L'attività di regolazione di diversi processi cellulari da parte della PLC-β1 infatti può essere dovuta sia all'idrolisi del PtdIns(4,5)P₂ che alla formazione dei due secondi messaggeri, ovvero il diacilglicerolo (DAG) e l'Ins(1,4,5)P₃. A livello nucleare l'Ins(1,4,5)P₃ può costituire un substrato dell'Ipmk che lo fosforila sequenzialmente producendo InsP₅ e InsP₆^{76, 94}. E' stato dimostrato che nelle cellule di

Discussione

mammifero l'InsP₆ è coinvolto in numerosi processi fisiologici, quali l'endocitosi⁹⁵, l'apoptosi⁹⁶, la riparazione del DNA^{88, 97} e il *trafficking* delle vescicole⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Studi condotti sul lievito hanno inoltre evidenziato che l'Ipmk, chiamata anche Arg82, può prendere parte alla regolazione del processo di trascrizione genica. In particolare questa proteina è in grado di promuovere l'assemblaggio di complessi trascrizionali a livello dei promotori di alcuni geni. E' stato inoltre ipotizzato che questi complessi possano essere presenti in forma inattiva a livello degli elementi regolatori di questi geni e che vengano attivati in risposta all'attivazione dell'Ipmk. Quindi questa chinasi potrebbe rappresentare l'enzima che effettivamente controlla la trascrizione dei geni interessati⁷⁵. Dunque cambiamenti dei livelli di molecole che partecipano alla trasduzione del segnale insieme con l'attivazione dell'Ipmk potrebbero determinare una rapida stimolazione dell'attivazione della trascrizione genica¹⁰¹. Tuttavia non è ancora stato chiarito se gli effetti dell'Ipmk sulla trascrizione siano legati intrinsecamente al dominio catalitico della proteina o se al contrario siano promossi dagli stessi fosfoinositidi che agiscono come secondi messaggeri. Quindi le chinasi degli inositoli fosfati potrebbero presentare una funzione ulteriore rispetto alla loro attività enzimatica, ovvero la capacità di regolare la trascrizione¹⁰².

Nell'insieme dunque in questo lavoro abbiamo dimostrato che nel processo di differenziamento miogenico indotto dall'insulina l'espressione della ciclina D3 viene regolata dalla via di trasduzione del segnale dipendente dalla PLC-β1 tramite l'attivazione del fattore di trascrizione c-jun. Inoltre abbiamo mostrato che questa via di trasduzione coinvolge a livello nucleare la chinasi IPMK.

Infine è importante ricordare che molti studi hanno dimostrato che l'espressione e l'accumulo della ciclina D3 sono necessari per l'induzione e il mantenimento del processo di differenziamento miogenico. Il nostro lavoro quindi non solo ribadisce l'importanza della ciclina D3 in questo processo, ma soprattutto fornisce una visione più completa della via di trasduzione del segnale responsabile dell'induzione della trascrizione della ciclina D3 nel differenziamento. In questo contesto la PLC-β1 nucleare è risultata essere responsabile della generazione di segnali molecolari che attraverso il coinvolgimento dell'Ipmk e di c-jun determinano l'induzione del promotore della ciclina D3.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Weintraub, H. et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251, 761-6 (1991).
2. Chambers, R. L. & McDermott, J. C. Molecular basis of skeletal muscle regeneration. *Can J Appl Physiol* 21, 155-84 (1996).
3. Megeney, L. A. & Rudnicki, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73, 723-32 (1995).
4. Perry, R. L. & Rudnick, M. A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 5, D750-67 (2000).
5. Friday, B. B., Mitchell, P. O., Kegley, K. M. & Pavlath, G. K. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation* 71, 217-27 (2003).
6. Tomczak, K. K. et al. Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *Faseb J* 18, 403-5 (2004).
7. Sabourin, L. A. & Rudnicki, M. A. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 57, 16-25 (2000).
8. Yun, K. & Wold, B. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol* 8, 877-89 (1996).
9. Gossett, L. A., Kelvin, D. J., Sternberg, E. A. & Olson, E. N. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 9, 5022-33 (1989).
10. Naya, F. J. & Olson, E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11, 683-8 (1999).
11. Blackwell, T. K. & Weintraub, H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104-10 (1990).
12. Berkes, C. A. & Tapscott, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 16, 585-95 (2005).
13. Andres, V. & Walsh, K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol* 132, 657-66 (1996).
14. Franklin, D. S. & Xiong, Y. Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. *Mol Biol Cell* 7, 1587-99 (1996).
15. Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. & Arnold, H. H. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *Embo J* 8, 701-9 (1989).

Bibliografia

16. Edmondson, D. G. & Olson, E. N. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* 3, 628-40 (1989).
17. Molkenkin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F. & Olson, E. N. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83, 1125-36 (1995).
18. Wasserman, W. W. & Fickett, J. W. Identification of regulatory regions which confer muscle-specific gene expression. *J Mol Biol* 278, 167-81 (1998).
19. Bergstrom, D. A. et al. Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol Cell* 9, 587-600 (2002).
20. Halevy, O. et al. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-21 (1995).
21. Zhang, P. et al. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev* 13, 213-24 (1999).
22. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-4 (1995).
23. Walsh, K. & Perlman, H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 7, 597-602 (1997).
24. Jahn, L., Sadoshima, J. & Izumo, S. Cyclins and cyclin-dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 muscle cells. *Exp Cell Res* 212, 297-307 (1994).
25. Kiess, M., Gill, R. M. & Hamel, P. A. Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene* 10, 159-66 (1995).
26. 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* 19, 1383-92 (2007).
27. Rhee, S. G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70, 281-312 (2001).
28. Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T. & Lai, F. A. PLC ζ (zeta): a sperm protein that triggers Ca $^{2+}$ oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 17, 264-73 (2006).
29. Rhee, S. G. & Bae, Y. S. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 272, 15045-8 (1997).
30. Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H. & Lee, S. Y. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244, 546-50 (1989).

Bibliografia

31. Rameh, L. E. & Cantley, L. C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274, 8347-50 (1999).
32. Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. & Fesik, S. W. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-70 (1994).
33. Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M. & Williams, R. L. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380, 595-602 (1996).
34. Lopez, I., Mak, E. C., Ding, J., Hamm, H. E. & Lomasney, J. W. A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276, 2758-65 (2001).
35. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. & Sigler, P. B. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83, 1037-46 (1995).
36. Katan, M. Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1436, 5-17 (1998).
37. Wang, T., Pentylala, S., Rebecchi, M. J. & Scarlata, S. Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C-beta 1, C-beta 2, and C-delta 1 with lipid bilayers and the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* 38, 1517-24 (1999).
38. Razzini, G., Brancaccio, A., Lemmon, M. A., Guarnieri, S. & Falasca, M. The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta(1). *J Biol Chem* 275, 14873-81 (2000).
39. Ellis, M. V. et al. Catalytic domain of phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC). Mutational analysis of residues within the active site and hydrophobic ridge of plcdelta1. *J Biol Chem* 273, 11650-9 (1998).
40. Essen, L. O., Perisic, O., Lynch, D. E., Katan, M. & Williams, R. L. A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C-delta1. *Biochemistry* 36, 2753-62 (1997).
41. Yamamoto, T. et al. Involvement of EF hand motifs in the Ca(2+)-dependent binding of the pleckstrin homology domain to phosphoinositides. *Eur J Biochem* 265, 481-90 (1999).
42. Rhee, S. G. & Choi, K. D. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 267, 12393-6 (1992).
43. Ellis, M. V., Carne, A. & Katan, M. Structural requirements of phosphatidylinositol-specific phospholipase C delta 1 for enzyme activity. *Eur J Biochem* 213, 339-47 (1993).

Bibliografia

44. Cheng, H. F. et al. Cloning and identification of amino acid residues of human phospholipase C delta 1 essential for catalysis. *J Biol Chem* 270, 5495-505 (1995).
45. Ellis, M. V., U, S. & Katan, M. Mutations within a highly conserved sequence present in the X region of phosphoinositide-specific phospholipase C-delta 1. *Biochem J* 307 (Pt 1), 69-75 (1995).
46. Bruzik, K. S., Morocho, A. M., Jhon, D. Y., Rhee, S. G. & Tsai, M. D. Phospholipids chiral at phosphorus. Stereochemical mechanism for the formation of inositol 1-phosphate catalyzed by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* 31, 5183-93 (1992).
47. Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Sudhof, T. C. & Sprang, S. R. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929-38 (1995).
48. Lomasney, J. W., Cheng, H. F., Roffler, S. R. & King, K. Activation of phospholipase C delta 1 through C2 domain by a Ca(2+)-enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *J Biol Chem* 274, 21995-2001 (1999).
49. Wang, T. et al. Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and -beta2 with activated Galphaq subunits: an alternative function for C2-signaling modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7843-6 (1999).
50. Heinz, D. W., Essen, L. O. & Williams, R. L. Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C. *J Mol Biol* 275, 635-50 (1998).
51. Lee, C. H., Park, D., Wu, D., Rhee, S. G. & Simon, M. I. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *J Biol Chem* 267, 16044-7 (1992).
52. Kim, C. G., Park, D. & Rhee, S. G. The role of carboxyl-terminal basic amino acids in Gqalpha-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* 271, 21187-92 (1996).
53. Park, D., Jhon, D. Y., Lee, C. W., Lee, K. H. & Rhee, S. G. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* 268, 4573-6 (1993).
54. Crouch, M. F. & Simson, L. The G-protein G(i) regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of G(i). *Faseb J* 11, 189-98 (1997).
55. Martelli, A. M. 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

Bibliografia

- paralleled by increased phosphorylation of the phospholipase. *J Cell Biochem* 72, 339-48 (1999).
56. Martelli, A. 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* 486, 230-6 (2000).
 57. Vitale, M. et al. Interleukin 2 activates nuclear phospholipase Cbeta by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation in human natural killer cells. *Faseb J* 15, 1789-91 (2001).
 58. Xu, A. et al. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* 21, 2981-90 (2001).
 59. Xu, A., Wang, Y., Xu, L. Y. & Gilmour, R. S. Protein kinase C alpha -mediated negative feedback regulation is responsible for the termination of insulin-like growth factor I-induced activation of nuclear phospholipase C beta1 in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 276, 14980-6 (2001).
 60. Litosch, I. G-protein betagamma subunits antagonize protein kinase C-dependent phosphorylation and inhibition of phospholipase C-beta1. *Biochem J* 326 (Pt 3), 701-7 (1997).
 61. Irvine, R. F. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 349-60 (2003).
 62. Yaffe, D. & Saxel, O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* 7, 159-66 (1977).
 63. Florini, J. R., Ewton, D. Z. & Magri, K. A. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annu Rev Physiol* 53, 201-16 (1991).
 64. Manzoli, L. et al. Nuclear phospholipase C: involvement in signal transduction. *Prog Lipid Res* 44, 185-206 (2005).
 65. Faenza, I. et al. Expression of phospholipase C beta family isoenzymes in C2C12 myoblasts during terminal differentiation. *J Cell Physiol* 200, 291-6 (2004).
 66. Faenza, I. et al. Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter. *Endocrinology* 148, 1108-17 (2007).
 67. Matteucci, A. et al. Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C beta 1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells. *Cancer Res* 58, 5057-60 (1998).
 68. Faenza, I. et al. Up-regulation of nuclear PLCbeta1 in myogenic differentiation. *J Cell Physiol* 195, 446-52 (2003).

Bibliografia

69. Cenciarelli, C. et al. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 5203-17 (1999).
70. Wang, Z., Sicinski, P., Weinberg, R. A., Zhang, Y. & Ravid, K. Characterization of the mouse cyclin D3 gene: exon/intron organization and promoter activity. *Genomics* 35, 156-63 (1996).
71. Mariappan, I. & Parnaik, V. K. Sequestration of pRb by cyclin D3 causes intranuclear reorganization of lamin A/C during muscle cell differentiation. *Mol Biol Cell* 16, 1948-60 (2005).
72. Evangelisti, C. et al. Subnuclear localization and differentiation-dependent increased expression of DGK-zeta in C2C12 mouse myoblasts. *J Cell Physiol* 209, 370-8 (2006).
73. Ross, E. M. et al. Structural determinants for phosphatidic acid regulation of phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* 281, 33087-94 (2006).
74. Faenza, I. et al. Nuclear phospholipase C beta1 and cellular differentiation. *Front Biosci* 13, 2452-63 (2008).
75. Odom, A. R., Stahlberg, A., Wenthe, S. R. & York, J. D. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287, 2026-9 (2000).
76. Saiardi, A. et al. Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2306-11 (2001).
77. Saiardi, A., Erdjument-Bromage, H., Snowman, A. M., Tempst, P. & Snyder, S. H. Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. *Curr Biol* 9, 1323-6 (1999).
78. York, J. D. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim Biophys Acta* 1761, 552-9 (2006).
79. Resnick, A. C. et al. Inositol polyphosphate multikinase is a nuclear PI3-kinase with transcriptional regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12783-8 (2005).
80. Jones, D. R. & Divecha, N. Linking lipids to chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 14, 196-202 (2004).
81. Fujii, M. & York, J. D. A role for rat inositol polyphosphate kinases rIPK2 and rIPK1 in inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate production in rat-1 cells. *J Biol Chem* 280, 1156-64 (2005).
82. Nalaskowski, M. M., Deschermeier, C., Fanick, W. & Mayr, G. W. The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization. *Biochem J* 366, 549-56 (2002).

Bibliografia

83. Divecha, N. et al. Nuclear diacylglycerol, the cell cycle, the enzymes and a red herring (or how we came to love phosphatidylcholine). *Biochem Soc Trans* 25, 571-5 (1997).
84. Stevenson-Paulik, J., Bastidas, R. J., Chiou, S. T., Frye, R. A. & York, J. D. Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12612-7 (2005).
85. Verbsky, J. W., Wilson, M. P., Kisseleva, M. V., Majerus, P. W. & Wentz, S. R. The synthesis of inositol hexakisphosphate. Characterization of human inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase. *J Biol Chem* 277, 31857-62 (2002).
86. Feng, Y., Wentz, S. R. & Majerus, P. W. Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 875-9 (2001).
87. Miller, A. L. et al. Cytoplasmic inositol hexakisphosphate production is sufficient for mediating the Gle1-mRNA export pathway. *J Biol Chem* 279, 51022-32 (2004).
88. Hanakahi, L. A., Bartlett-Jones, M., Chappell, C., Pappin, D. & West, S. C. Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell* 102, 721-9 (2000).
89. Wang, Z., Zhang, Y., Lu, J., Sun, S. & Ravid, K. Mpl ligand enhances the transcription of the cyclin D3 gene: a potential role for Sp1 transcription factor. *Blood* 93, 4208-21 (1999).
90. Cocco, L. et al. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem J* 248, 765-70 (1987).
91. Andreucci, J. J. et al. Composition and function of AP-1 transcription complexes during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 277, 16426-32 (2002).
92. Ye, K. PIKE/nuclear PI 3-kinase signaling in preventing programmed cell death. *J Cell Biochem* 96, 463-72 (2005).
93. Smith, M. R. et al. Phospholipase C-gamma 1 can induce DNA synthesis by a mechanism independent of its lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6554-8 (1994).
94. Frederick, J. P. et al. An essential role for an inositol polyphosphate multikinase, Ipk2, in mouse embryogenesis and second messenger production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8454-9 (2005).
95. Hoy, M. et al. Inositol hexakisphosphate promotes dynamin I-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6773-7 (2002).

Bibliografia

96. Verbsky, J. & Majerus, P. W. Increased levels of inositol hexakisphosphate (InsP₆) protect HEK293 cells from tumor necrosis factor (alpha)- and Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 29263-8 (2005).
97. Hanakahi, L. A. & West, S. C. Specific interaction of IP₆ with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *Embo J* 21, 2038-44 (2002).
98. Voglmaier, S. M. et al. Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 158-63 (1992).
99. Norris, F. A., Ungewickell, E. & Majerus, P. W. Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. *J Biol Chem* 270, 214-7 (1995).
100. Ye, W., Ali, N., Bembenek, M. E., Shears, S. B. & Lafer, E. M. Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem* 270, 1564-8 (1995).
101. Rando, O. J., Chi, T. H. & Crabtree, G. R. Second messenger control of chromatin remodeling. *Nat Struct Biol* 10, 81-3 (2003).
102. Shears, S. B. How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochem J* 377, 265-80 (2004).