

Anno Accademico 2008-2009

Università degli Studi di Milano-Bicocca
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale
Laboratorio di Patologia Generale

Corso di Dottorato in Tecnologie Biomediche (Ciclo XXII)



STUDIO E CARATTERIZZAZIONE
DELLE ISOFORME DELLA TIROSINO CHINASI NON RECETTORIALE ARG
NEL DIFFERENZIAMENTO NEURONALE IN VITRO

TESI DI DOTTORATO

Dott.ssa Valentina ANGELONI
Matricola 033200

Coordinatore: Prof.ssa Marina DEL PUPPO
Tutor: Dott.ssa Cristina BIANCHI
Co-Tutor: Prof. Roberto PEREGO

INDICE

INDICE	3
INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE	5
ELENCO ABBREVIAZIONI	8
RIASSUNTO	10
INTRODUZIONE	14
TIROSINO CHINASI NON RECETTORIALI	14
Caratteristiche generali	14
Sottofamiglia Abelson	15
ARG e ABL: somiglianze strutturali	15
ARG: isoforme e loro relativa espressione	18
ARG e ABL: regolazione dell'attività chinasica	20
FUNZIONI DI ARG	23
Ruolo di Arg nella neuritogenesi	23
Ruolo di Arg a livello postsinaptico nell'assemblaggio della giunzione neuromuscolare.....	27
Ruolo di Arg nei meccanismi di migrazione e adesione cellulare.....	27
Arg e la regolazione del proteasoma.....	30
Ruolo di Arg nello stress ossidativo	30
Potenziale oncogeno di Arg.....	33
MATERIALI E METODI	37
1. Linee cellulari	37
2. Trattamenti cellulari.....	38
3. Analisi delle immagini in contrasto di fase	39
4. Vettori e transfezioni	39

5. Immunofluorescenza.....	40
6. Estrazione di RNA mediante TRIZOL®	41
7. Sintesi di cDNA.....	42
8. Real-Time Polymerase Chain Reaction.....	42
<i>8.1 Caratteristiche delle sonde e dei primers utilizzati</i>	44
8.2 Condizioni di Real-Time PCR e analisi dei dati.....	46
8.2.1 Quantificazione relativa di un trascritto mediante il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$	46
8.2.2 Quantificazione relativa di un trascritto mediante il metodo del $2^{-\Delta'CT}$	49
9. LONG e Nested Polymerase Chain Reaction.....	50
10. Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide e western blot.....	52
10.1 Elettroforesi su gel di poliacrilammide.....	52
10.2 Western blot.....	53
SCOPO DELLA RICERCA	55
RISULTATI	57
Dimostrazione dell'esistenza delle 8 isoforme full-length di Arg nella linea cellulare Caki-1.....	57
Studio del coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme nel differenziamento neurone indotto nelle cellule SH-SY5Y mediante trattamento con 20 μ M ATRA.....	61
Analisi morfologica e molecolare di cellule SH-SY5Y transfettate con le diverse isoforme di Arg	69
Studio del coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme ne differenziamento indotto nelle cellule SH-SY5Y con 0,01 μ M Abeta	77
DISCUSSIONE	86
BIBLIOGRAFIA	92

INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

- Figura 1:** Rappresentazione schematica della struttura delle proteine Abl e Arg pag. 17
- Figura 2:** Rappresentazione schematica delle isoforme di Arg pag. 19
- Figura 3:** Composizione in esoni del gene ARG pag. 19
- Figura 4:** Rappresentazione schematica del gene di fusione ETV6/ARG pag. 34
- Figura 5:** Rappresentazione schematica del funzionamento delle sonde Taqman pag. 44
- Figura 6:** Rappresentazione schematica delle isoforme proteiche di Arg pag. 50
- Figura 7:** Rappresentazione schematica delle 8 isoforme full-length di Arg pag. 57
- Figura 8:** Quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg pag. 58
- Figura 9:** Ampliconi ottenuti mediante Long PCR nella linea cellulare Caki-1 pag. 59
- Figura 10:** Ampliconi ottenuti mediante Nested PCR nella linea cellulare Caki-1 pag. 60
- Figura 11:** Cellule SH-SY5Y in coltura pag. 61
- Figura 12:** Analisi mediante immunofluorescenza di cellule SH-SY5Y dopo 6 giorni di trattamento pag. 62
- Figura 13:** Quantificazione della lunghezza media dei neuriti e del numero di neuriti per cellula pag. 63
- Figura 14:** Quantificazione relativa tramite Real-Time PCR del livello totale del trascritto di Arg pag. 64
- Figura 15:** Quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg nella linea cellulare SH-SY5Y trattata e non con ATRA pag. 65
- Figura 16 A:** Western blot dei lisati delle cellule SH-SY5Y controllo (CTRL) e trattate con ATRA (ATRA) pag. 67
- Figura 16 B:** Analisi densitometrica delle bande proteiche di Arg pag. 67

- Figura 17:** Analisi densitometrica della banda proteica di PY1105p190RhoGAP in cellule SH-SY5Y controllo e dopo 6 giorni di trattamento con 20 μ M ATRA pag. 68
- Figura 18:** Analisi mediante immunofluorescenza delle cellule SH-SY5Y transfettate con le diverse isoforme full-length di Arg pag. 70
- Figura 19:** Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate con l'isoforma BLCTS pag. 71
- Figura 20:** Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate con l'isoforma ALCTS pag. 72
- Figura 21:** Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate con il controllo negativo LAC Z pag. 73
- Figura 22:** Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate osservate lungo il piano z pag. 74
- Figura 23:** Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate osservate lungo il piano z pag. 74
- Figura 24:** Analisi in immunofluorescenza di cellule SH-SY5Y transfettate pag. 75
- Figura 25:** Analisi densitometrica delle bande proteiche corrispondenti a A) p190RhoGAP fosforilato in Y1105 B)Flag-Arg pag. 76
- Figura 26:** Cellule SH-SY5Y in coltura pag. 77
- Figura 27:** Analisi mediante immunofluorescenza di cellule SH-SY5Y dopo 72 ore di trattamento con 0,01 μ M Abeta pag. 78
- Figura 28:** Quantificazione della lunghezza media dei neuriti e del numero di neuriti per cellula pag. 79
- Figura 29:** Quantificazione relativa mediante Real-Time PCR del livello del trascritto totale di Arg pag. 80
- Figura 30:** Quantificazione mediante Real-Time PCR delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg nella linea cellulare SH-SY5Y trattata con 0,01 μ M Abeta per 24, 48 e 72 ore pag. 81
- Figura 31 A:** Western blot dei lisati delle cellule SH-SY5Y controllo e trattate con 0,01 μ M Abeta per 24, 48 e 72 ore pag. 82
- Figura 31 B:** Analisi densitometrica delle bande proteiche di Arg pag. 82

- Figura 32:** Analisi densitometrica della banda proteica di Y1105 di p190RhoGAP in cellule SH-SY5Y controllo e dopo 72 ore di trattamento con 0,01 μ M Abeta pag. 83
- Figura 33:** Quantificazione relativa mediante Real-Time PCR del livello del trascritto totale di Arg pag. 84
- Figura 34:** Quantificazione mediante Real-Time PCR delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg pag. 85
-
- Tabella 1:** Sonde e primers utilizzati per gli esperimenti di Real-Time PCR pag. 45
- Tabella 2:** Sequenza dei primers utilizzati nelle due reazioni di PCR e loro localizzazione pag. 51
- Tabella 3:** Schema dei primers utilizzati e dei relativi ampliconi ottenuti nelle reazioni di Long PCR e Nested PCR pag. 59

ELENCO ABBREVIAZIONI

ABD: Actin binding domain
Abi: Abelson-Interactor protein
ABL: Abelson tyrosine kinase
ADP: Adenosine Diphosphate
APP: amyloid precursor protein
ARG: Abelson Related Gene
ATP: Adenosin triphosphate
ATRA: All-Trans-Retinoic-Acid
BSA: Albumin Bovine serum
CH: Calponin Homology
CTL: Carbossi-Terminal “Long”
CTS: Carbossi-Terminal “Short”
DAG: Diacil-Glicerolo
DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMSO: Dimethyl Sulfoxide
Ena: Drosophila Enabled
FBS: Fetal Bovine Serum
FITC: Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated
GAP: GTPase Activating Protein
GDP: Guanosine Diphosphate
GEF: guanine-nucleotide exchange factor
GTP: Guanosine Triphosphate
MAP-2: Microtubule associated protein
Mena: Mammalian Enabled
MuSK: Muscle specific kinase
NES: Nuclear Exportation Signal
NLS: Nuclear Localization Signal
OD: Optic Density
PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor

PKC: Proteina chinasi C

PLC γ 1: Phospholipase-C γ 1

ROS: Reactive Oxygen Species

SH2: Src Homology domain 2

SH3: Src Homology domain 3

TPA: 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate

TPK: Tyrosine Protein Kinase

VASP: Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein

YFP: Yellow Fluorescent Protein

Δ CT: Deleted Carbossi-Terminal region

RIASSUNTO

Il gene umano ARG (o ABL2) codifica per una proteina che appartiene alla sottofamiglia Abelson delle tirosino chinasi non recettoriali (Kruh et al., 1990; Perego et al., 1991). Arg in vitro dei domini di legame alle proteine del citoscheletro (Hernandez et al., 2004a e Miller et al., 2004) e al coinvolgimento, mediante la sua attività chinasi, nei pathway molecolari di riarrangiamento del citoscheletro (Galkin et al., 2005) è attivamente coinvolto nel processo di neuritogenesi e di formazione e funzione delle sinapsi (Koleske et al., 1998). Come per c-Abl anche per Arg sono state descritte, per splicing alternativo dell'esone 1, due isoforme N-terminali (1A e 1B) (Kruh et al., 1990). Nel nostro laboratorio sono state identificate con metodiche di RT-PCR qualitativa nuovi trascritti di Arg che predicono isoforme con diverse estremità 5' e 3' (Perego et al., 2005). Per quanto riguarda le estremità 5' si è dimostrato che l'escissione alternativa dell'esone 2, giustapposto all'esone 1A o 1B, produce quattro diversi trascritti definiti B-Long (BL), B-Short (BS), A-Long (AL) e A-Short (AS) (Perego et al., 2005). Le forme "Long" mantengono l'esone 2 costituito da 63 paia di basi e lo splicing alternativo di questo esone non interrompe l'open reading frame della proteina. All'estremità 3' sono state invece identificate 2 ulteriori isoforme che differiscono per una sequenza, detta Δ CT, di 309 paia di basi corrispondenti a 103 amminoacidi e che sono state definite come "Short" e "Long" (CTS e CTL) a seconda che abbiano perso o meno questa sequenza; la delezione della sequenza Δ CT elimina parte del primo sito legante l'actina (Perego et al., 2005). I trascritti corrispondenti alle diverse estremità 5' e 3' sono differenzialmente espressi nei vari tipi cellulari e durante la differenziazione mieloide e linfoide (Perego et al., 2005). Combinando i diversi splicing dell'estremità 5' e 3' è possibile ipotizzare l'esistenza di otto diverse isoforme full-length di Arg (ASCTS, ALCTS, ASCTL, ALCTL, BSCTS, BLCTS, BSCTL e BLCTL), dotate di diversa possibilità di interazione con il citoscheletro e differente coinvolgimento in pathways metabolici.

Per dimostrare l'effettiva espressione endogena dei trascritti corrispondenti alle otto diverse isoforme full-length di Arg abbiamo prima analizzato, mediante Real-Time

PCR, il pattern d'espressione delle diverse estremità 5' e 3' del trascritto di Arg nelle linee cellulari renali Hek 293T e Caki-1. Abbiamo così evidenziato che le estremità 5' sono tutte espresse solo nelle cellule Caki-1, a differenza delle cellule Hek 293T, che esprimono solo le forme B. Le estremità 3' invece sono espresse, anche se con rapporti quantitativi differenti, in entrambe le linee.

La linea cellulare Caki-1 è stata quindi utilizzata per dimostrare l'effettiva espressione dei trascritti corrispondenti alle 8 diverse isoforme di Arg mediante cicli sequenziali di PCR (Long e Nested PCR) che utilizzavano combinazioni di diversi primers specifici. La presenza di amplificati della dimensione attesa per le diverse isoforme full-length dimostra, in queste linea cellulare, l'effettiva espressione di tutti 8 i trascritti full-length di Arg predetti.

Una volta dimostrata l'esistenza delle otto isoforme di Arg abbiamo cercato di valutarne il coinvolgimento in un modello di differenziamento neuronale "*in vitro*", basandoci sui dati di letteratura che vedono Arg coinvolto nella neuritogenesi e nella formazione e funzione delle sinapsi (Koleske et al., 1998). Pertanto la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y è stata indotta al differenziamento per trattamento con ATRA (All-Trans-Retinoic-Acid) e Abeta (peptide amiloidogeno (A β 1-42)), che come documentato in letteratura è dotata a basse concentrazioni di attività neurotrofica (Susen and Blochl, 2005). L'effetto differenziativo prodotto sulla linea cellulare SH-SY5Y da questi trattamenti è stato documentato mediante analisi morfologica e in immunofluorescenza, mentre tramite Real-Time PCR e western blot si sono quantificati i livelli del trascritto e della proteina di Arg prima e dopo trattamento ed analizzati i livelli di espressione relativa dei trascritti corrispondenti alle diverse estremità 5' e 3', allo scopo di evidenziare eventuali variazioni in corso di differenziamento. Inoltre sulla base dei dati di letteratura che evidenziano il ruolo di Arg come promotore della neuritogenesi in cellule di neuroblastoma N2A (Hernandez et al., 2004b) per attivazione dell'inibitore di Rho p190RhoGAP, in seguito a fosforilazione Arg-dipendente della sua tirosina 1105 (Y1105), è stato analizzato il livello di p190RhoGAP fosforilato in Y1105. Nelle cellule SH-SY5Y, trattate con 20 μ M ATRA per 6 giorni, Arg sembra essere coinvolto in un pathway neurodifferenziativo p190RhoGAP-dipendente, infatti il trascritto totale di Arg incrementa e sebbene il livello proteico di Arg sia paragonabile a quello delle cellule controllo, il livello di p190RhoGAP fosforilato in Y1105 risulta aumentato. Arg sembra essere coinvolto anche nel processo neurodifferenziativo a cui le cellule SH-SY5Y vanno incontro per trattamento con 0,01 μ M Abeta per 72 ore,

infatti l'analisi mediante Real-Time PCR e western blot ha mostrato un'over-espressione sia del trascritto che della proteina totale di Arg nelle cellule SH-SY5Y trattate con Abeta rispetto alle cellule controllo. Inoltre il pattern di espressione delle isoforme di Arg, analizzato tramite Real-Time PCR, ha mostrato una maggiore espressione del trascritto con estremità 3' di tipo CTL rispetto alla controparte CTS, al contrario di quanto succede nelle cellule controllo. L'analisi del livello di p190RhoGAP fosforilato in tirosina 1105 non mostra però nelle cellule trattate con Abeta una variazione rispetto alle cellule controllo. Questi dati fanno ipotizzare un coinvolgimento di Arg in un pathway di neuritogenesi p190RhoGAP-indipendente, diverso quindi da quello attivato dal trattamento con ATRA nelle cellule SH-SY5Y. Del resto è stato anche descritto che in cellule di neuroblastoma N2A la transfezione di Arg può indurre la neuritogenesi senza indurre inibizione di Rho e quindi attraverso un pathway p190RhoGAP-indipendente (Hernandez et al., 2004b). Ulteriori studi sono in corso per valutare il coinvolgimento di Arg in pathway alternativi a quello di Rho nel processo di neuritogenesi indotto da Abeta.

Date le sopra citate caratteristiche di Arg e il suo ruolo nel sistema nervoso centrale visto il ruolo di Abl nel taglio proteolitico del precursore della proteina amiloide (APP) (Perkinton et al., 2004) Abbiamo valutato l'espressione di Arg e delle sue isoforme anche in colture primarie di fibroblasti prelevati da pazienti affetti da Alzheimer rispetto ai controlli sani, riscontrando un'over-espressione del trascritto totale di Arg. Questo dato rappresenta il punto di partenza per studi futuri che mirino a definire il possibile coinvolgimento di Arg nel metabolismo della proteina precursore dall'amiloide APP. Ulteriori studi verranno eseguiti utilizzando concentrazioni potenzialmente neurotossiche di Abeta (2,5µM) per stimolare le cellule SH-SY5Y al fine di valutarne l'effetto sull'espressione delle isoforme di Arg e sulla morfologia cellulare.

Per valutare se le otto diverse isoforme full-length di Arg possono avere ruoli diversi nel differenziamento neuronale abbiamo anche approntato studi di tipo funzionale. Transfettando nella linea cellulare SH-SY5Y le otto diverse isoforme di Arg clonate nel vettore di espressione pFlagCMV2. Questi esperimenti hanno evidenziato che le isoforme BLCTL e BSCTL inducono nelle cellule transfettate l'acquisizione di una morfologia più rotondeggiante e una significativa diminuzione dello "spreading cellulare" rispetto alle cellule transfettate con il vettore controllo (LAC Z). L'isoforma BLCTS è invece tra le isoforme B quella che induce una maggiore produzione di protrusioni cellulari quando transfettate nella linea SH-SY5Y. In seguito a transfezione

con le isoforme A, normalmente non espresse in questo tipo cellulare, ed in particolare con l'isoforma ALCTS, le cellule sviluppano un fenotipo ricco di estroflessioni di diversa lunghezza e spesso filopodiformi. Dato il ruolo di Arg, documentato in letteratura, nel riarrangiamento del citoscheletro (Galkin et al., 2005), abbiamo voluto poi valutare l'effetto sul citoscheletro di actina e tubulina dell'over-espressione delle isoforme BLCTS e ALCTS, che quando over-espresse inducono in modo più evidente la formazione di estroflessioni cellulari. Dall'analisi in immunofluorescenza delle cellule transfettate con le due isoforme BLCTS e ALCTS è emerso che quando nelle cellule SH-SY5Y viene over-espresa l'isoforma BLCTS la distribuzione dell'F-actina e della tubulina è corticale e paragonabile a quella delle cellule non transfettate mentre nelle cellule che over-esprimono l'isoforma ALCTS l'F-actina ha ancora una distribuzione corticale e paragonabile a quella delle cellule non transfettate, mentre la tubulina si accumula nel citoplasma dove colocalizza con Arg, diffondendo anche nel nucleo. Verranno eseguiti ulteriori studi per approfondire l'effetto dell'over-espressione delle singole isoforme, sia tramite trasfezioni stabili che inducibili delle otto isoforme full-length di Arg.

INTRODUZIONE

TIROSINO CHINASI NON RECETTORIALI

Caratteristiche generali

Le tirosino chinasi sono enzimi che catalizzano il trasferimento di un gruppo fosfato, usando l'ATP come donatore, ad un gruppo ossidrilico di uno specifico residuo di tirosina (Creighton, 1993). Inizialmente l'identificazione di proteine con attività tirosino chinasi è avvenuta studiando gli oncogeni virali (v-onc) (Pawson et al., 1988). Successivamente sono state isolate molte altre proteine dotate di attività tirosino chinasi, permettendo una loro prima suddivisione in: tirosino chinasi recettoriali e tirosino chinasi non recettoriali (Hanks et al., 1988). Le prime possiedono una regione transmembrana, una intra-citoplasmatica ed una extracellulare con la quale legano specifici substrati. Quando il ligando forma un complesso stabile con il recettore, si innescano una serie di eventi sequenziali che provvedono alla trasduzione dei segnali attraverso il citoplasma verso il nucleo, influenzando così il ciclo cellulare, l'espressione genica, l'architettura citoscheletrica, l'adesione e il differenziamento cellulare (Cantley et al., 1991).

Le tirosino chinasi non recettoriali si distinguono dalle precedenti sia per la mancanza della sequenza extracellulare che di quella transmembrana, anche se alcune di esse, come Src e Abl, sono comunque associate alla membrana (Bolen, 1993). Nella seconda metà degli anni '80 le tirosino chinasi non recettoriali erano raggruppate in tre sottofamiglie: Src, Fps/Fes ed Abl (Pawson et al., 1988). A queste, col tempo, ne sono state aggiunte altre, così da poter classificare le tirosino chinasi non recettoriali in dieci sottofamiglie (Robinson et al., 2000):

- ✓ Sottofamiglia di Src che comprende le chinasi Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk
- ✓ Sottofamiglia Abl, che comprende il prodotto del gene correlato ARG
- ✓ Sottofamiglia di Fps/Fes che comprende il prodotto del gene correlato FER
- ✓ Sottofamiglia di Fak
- ✓ Sottofamiglia di Csk

- ✓ Sottofamiglia di Zap e Syk
- ✓ Sottofamiglia di Janus comprendente le chinasi Jak-1, Jak-2 e Tyk2
- ✓ Sottofamiglia di Itk/Tsk, Bpk/Atk e Tec
- ✓ Sottofamiglia di Ack
- ✓ Sottofamiglia di Frk.

Comparando la sequenza amminoacidica di queste proteine si possono riconoscere in molte di esse, oltre alla regione funzionale tirosino chinasi caratteristica (TK), anche le regioni SH2 (Src homology domain 2) e SH3 (Src homology domain 3) e queste, essendo variamente disposte, permettono di distinguerle e classificarle (Bolen, 1993). Il dominio SH2 è costituito da circa 100 residui amminoacidici che sono stati per la prima volta identificati come una regione conservata tra le oncoproteine Src e Fps; SH2 ha affinità per i residui fosfotirosinici e influisce sulla conformazione delle proteine regolandone le attività funzionali (Pawson et al., 1992). Il dominio SH3, invece, è più piccolo, circa 60 amminoacidi, e conservato in gran parte delle tirosino chinasi citoplasmatiche; riconosce, grazie ai suoi residui aromatici altamente conservati, la sequenza consenso ricca in prolina (XPPXP) presente in svariati peptidi cellulari (Feller et al., 1994; Rickles et al., 1994). In alcuni casi si è dimostrato che il dominio SH3 può formare complessi con fattori di scambio del nucleotide guanina e con proteine che attivano le GTPasi (Ren et al., 1993).

Sottofamiglia Abelson

I prodotti dei geni ABL (Abelson tyrosine kinase; ABL1) e ARG (Abelson related gene; ABL2) rappresentano i membri della sottofamiglia Abelson delle tirosino chinasi non recettoriali (Pendergast, 2002).

ARG e ABL: somiglianze strutturali

Le tirosino chinasi della sottofamiglia Abl sono state identificate in mammifero, *Drosophila* e *C. elegans* e sono altamente conservate attraverso l'evoluzione.

Il gene ABL localizza al cromosoma 9, mentre il gene ARG al cromosoma 1, in particolare a livello della banda 1q 24-25 che coincide con un sito fragile costituzionale (Kruh et al., 1986). ABL trascrive per due mRNA, contemporaneamente presenti nella cellula, che nell'uomo hanno la dimensione di 6 Kb e 7 Kb (Shtivelman et al., 1986). I due trascritti, ubiquitariamente espressi, differiscono solo nell'estremità 5' in corrispondenza del primo esone e codificano per due proteine: Abl 1A e 1B (figura 1). La sequenza codificante di ARG è costituita da 3546 paia di basi e codifica per una proteina di 1182 amminoacidi (Kruh et al., 1990). Anche ARG dà luogo, per splicing alternativo, a diversi trascritti. Inizialmente ne furono descritti due che differivano solo nelle estremità 5' e che, per analogia con ABL, vennero definiti 1A e 1B (Kruh et al., 1990) (figura 1).

Le proteine Abl e Arg presentano un elevato grado di omologia strutturale e di sequenza, come riportato in figura 1. Entrambe contengono un sito di miristilazione all'N-terminale delle corrispondenti isoforme 1B ed è stato dimostrato che vengono miristilate in vivo (Pendergast, 2002). Questa modificazione post-traduzionale facilita l'associazione delle proteine alla membrana cellulare, permettendo loro di partecipare alla trasduzione del segnale.

Inoltre il dominio tirosino chinasi di Arg e di Abl presenta una omologia di sequenza pari al 94%, con una differenza tra i due di soli 16 amminoacidi. Anche i domini funzionali SH2 e SH3 delle due proteine presentano una elevata omologia (pari al 90%) (Kruh et al., 1990) ed entrambi sono coinvolti nella regolazione dell'attività chinasi (Kruh et al., 1990).

La lunga regione carbossi-terminale di Arg, costituita da 650 amminoacidi, è, invece, poco omologa con Abl, infatti condivide un'identità amminoacidica pari solo al 29% (Kruh et al., 1990). Tale somiglianza però aumenta al 57% se vengono considerati solo gli ultimi 60 amminoacidi (Kruh et al., 1990). Nel dominio carbossi-terminale di Arg vengono comunque mantenute regioni significative della struttura di Abl come alcune sequenze ricche in prolina (PXXP), le quali rappresentano potenziali siti di legame per domini SH3 di altre proteine (Pendergast, 2002).

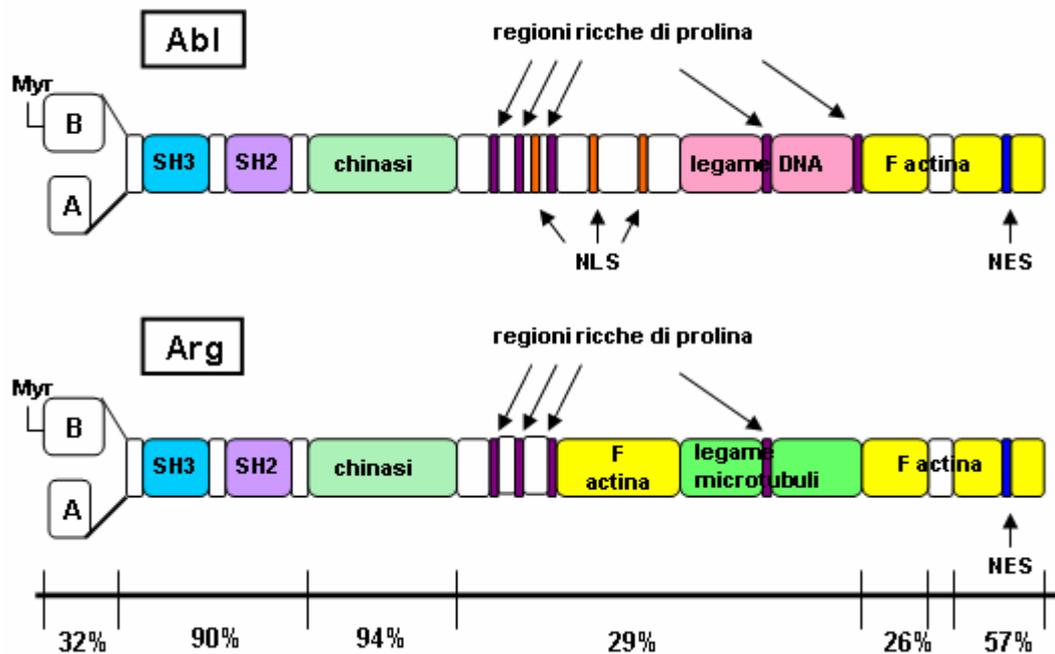


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura delle proteine Abl ed Arg. Per ogni dominio strutturale è indicata l'omologia di sequenza tra le due proteine. Sono indicati il sito di possibile miristilazione (Myr), i domini funzionali SH₃ e SH₂ e chinasi, i domini leganti F-actina e microtubuli, i segnali di localizzazione nucleare (NLS) e di esportazione nucleare (NES).

Al C-terminale di Abl si localizzano tre sequenze NLS (nuclear localization sequences), costituite da cinque residui di lisina; in questa regione Arg presenta una sequenza di tre amminoacidi basici che non sembra mantenere la funzione di segnale di localizzazione nucleare. Infatti gli studi condotti mediante frazionamento cellulare e analisi in immunofluorescenza indicano che Arg, nei diversi tipi cellulari analizzati, ha localizzazione essenzialmente citoplasmatica (Wang, 1993; Wang et al. 2001). Analogamente, la sequenza di esportazione nucleare (NES) ricca di leucine e presente anche in Arg è funzionale solo in Abl consentendo alla proteina un continuo spostamento dal nucleo al citoplasma e viceversa in risposta a segnali quali l'adesione cellulare alle proteine della matrice extracellulare (Pendergast, 2002).

La differente localizzazione delle due proteine implica che queste potrebbero avere sia ruoli sovrapposti che distinti nel signalling intracellulare.

Una caratteristica unica di Abl è la presenza di un sito di legame al DNA nella regione carbossi-terminale (figura 1).

Abl ed Arg si distinguono dalle altre tirosino chinasi non recettoriali per la presenza al terminale carbossilico di domini di legame per la F-actina (Hernandez et al., 2004a). In particolare in Arg è stato identificato un secondo dominio di legame alla F-actina, mancante in Abl e localizzato tra le regioni ricche in prolina (Wang et al., 2001). In fibroblasti in coltura è stato dimostrato che Arg richiede entrambi i siti per legare due filamenti diversi di F-actina, formando dunque un ponte molecolare tra essi; questi complessi molecolari ripetuti porterebbero alla formazione di fasci di F-actina (Wang et al., 2001). Nella porzione C-terminale di Arg (amminoacidi 924-1090) è inoltre presente un dominio di legame ai microtubuli (Miller et al., 2004). Una regione di 71 amminoacidi all'interno di questo dominio (tra gli amminoacidi 984 e 1054) condivide il 37% di identità amminoacidica con la regione C-terminale della dinamina, una GTPasi citoplasmatica che viene attivata attraverso il legame ai microtubuli (Herskovits et al., 1993). Tale regione presenta anche omologia di sequenza con i domini basici di MAP-2 (microtubule associated protein 2) e di Tau, i quali formano interazioni elettrostatiche con la regione C-terminale della tubulina. Arg, infatti, attraverso l'interazione con l'estremità positiva dei microtubuli, regola la struttura citoscheletrica promuovendo i meccanismi di protrusione e retrazione dei lamellipodi alla periferia cellulare (Miller et al., 2004). Questo suggerisce che le tirosino chinasi della sottofamiglia Abl di mammifero abbiano la capacità di alterare la struttura del citoscheletro sia direttamente grazie al loro legame all'actina, che indirettamente reclutando specifici substrati associati all'actina, i quali, una volta fosforilati dalle tirosino chinasi della sottofamiglia Abl, potrebbero modulare l'attività dinamica del citoscheletro

ARG: isoforme e loro relativa espressione

Nel nostro laboratorio sono stati identificati con metodiche di RT-PCR qualitativa nuovi trascritti di Arg con diverse estremità 5' e 3'. Si è infatti dimostrato che l'escissione alternativa dell'esone 2, fiancheggiante l'esone 1A o 1B, produce quattro diverse estremità 5' e sono definite A-Long (AL), A-Short (AS), B-Short (BS) e B-Long (BL) (Perego et al., 2005) (figura2).

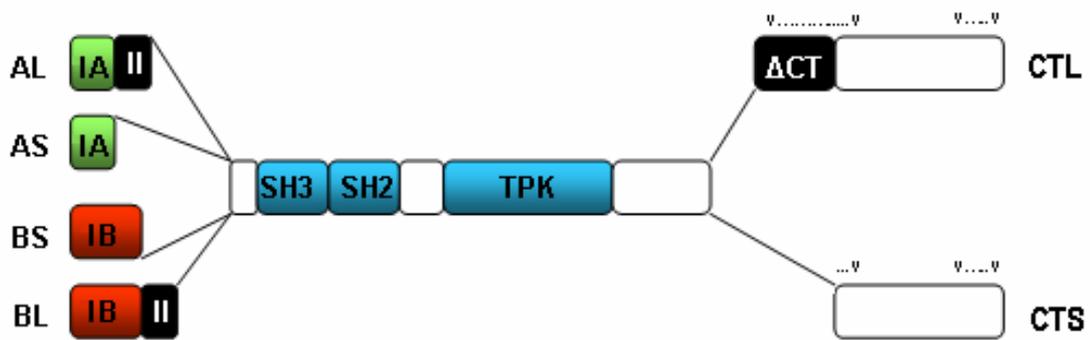


Figura 2: Rappresentazione schematica delle isoforme di Arg determinate, all'estremità 5' (AL, AS, BL e BS) dallo splicing alternativo dell'esone 2 (in nero), e all'estremità 3' (CTL e CTS) della regione Δ CT (in nero). E' indicata anche la posizione dei domini di legame alla F-actina (v...v), i domini Src Homology 3 (SH3) e Src Homology 2 (SH2) e il dominio tirosino chinasi (TPK).

Le forme "Long" mantengono l'esone 2 costituito da 63 paia di basi. Lo splicing alternativo di questo esone, corrispondente a 21 amminoacidi, non interrompe l'*open reading frame* della proteina.

All'estremità 3' sono state invece identificate due ulteriori isoforme che differiscono per una sequenza, detta Δ CT, di 309 paia di basi, corrispondente a 103 amminoacidi, e che sono state definite come "Short" e "Long" (CTS e CTL) a seconda che abbiano perso o meno questa sequenza (figura 2); la delezione della sequenza Δ CT elimina parte del primo sito legante l'actina (Perego et al., 2005).

Integrando questi risultati con le informazioni del database del NCBI Genome Map View Homo sapiens, Build 34, Versione1 è stata ottenuta la struttura in esoni del gene ARG, illustrata in figura 3.

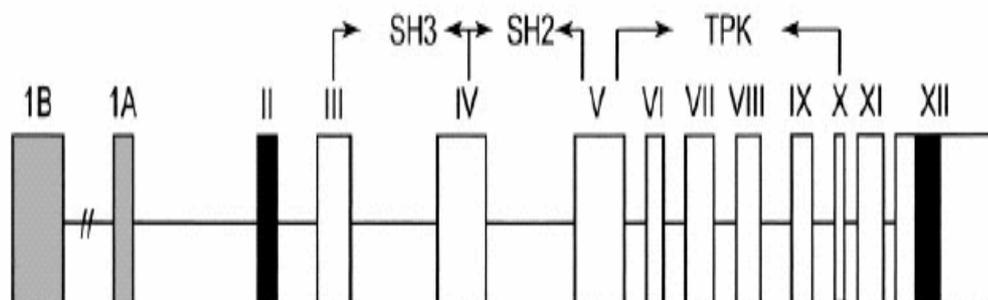


Figura 3: Composizione in esoni del gene ARG. In nero sono rappresentate le zone suscettibili di splicing (l'esone II e una parte dell'esone XII)

Studi quantitativi tramite Real-Time PCR mostrano per le diverse estremità 5' di Arg un pattern di espressione specifico nei diversi tipi cellulari. Nella maggior parte dei casi le forme più espresse al 5' sono le forme "Long", ovvero quelle che mantengono l'esone 2, sia nei tipi cellulari dove sono predominanti le forme A che in quelli dove prevalgono le B (Perego et al., 2005a). A questo proposito va notato che l'isoforma A inizialmente descritta (AS) (Kruh et al., 1990) è quella complessivamente meno espressa. Anche il pattern di espressione delle forme CTS e CTL può variare a seconda dei tipi cellulari: nelle linee ematopoietiche linfoidi B la quantità dei due corrispondenti trascritti sembra essere correlata al grado di maturazione. Infatti la forma CTL aumenta nelle cellule più mature, a scapito della forma CTS. Quest'ultima è meno abbondante rispetto all'isoforma CTL anche nelle linee cellulari linfoidi T e nei leucociti maturi, mentre nelle linee tumorali di tipo epiteliale l'isoforma CTS è più abbondante della CTL (Perego et al., 2005).

Il pattern di espressione delle isoforme di Arg è stato analizzato anche in una linea cellulare di leucemia mieloide acuta (HL-60). Questa linea è stata utilizzata per studi di induzione del differenziamento a granulocita mediante trattamento con ATRA (*All Trans Retinoic-Acid*) 1 µM, e a macrofago tramite trattamento con TPA (12-O-tetradecanoil-phorbolo-13-acetato) 10nM. La somministrazione di ATRA e TPA induce un aumento complessivo del livello di espressione dei trascritti di Arg (Perego et al., 1998). Inoltre, durante il differenziamento a macrofago, si verifica un cambiamento del pattern di espressione delle quattro estremità 5', con un aumento significativo delle forme A (in particolare AL) rispetto alla controparte B. Non si riscontra invece un cambiamento significativo nel pattern di espressione delle estremità 3': rimane infatti costante la prevalenza della forma CTS sulla forma CTL. Al contrario, nel processo di differenziamento a granulocita indotto dall'ATRA si riscontra un aumento della forma CTL. In questo caso però non si osservano significative variazioni nei rapporti quantitativi delle estremità 5' (Perego et al., 2005).

ARG e ABL: regolazione dell'attività chinastica

L'attività tirosino chinastica di Abl e di Arg deve essere strettamente regolata poiché una attività catalitica costitutiva delle due proteine attiverrebbe alcune vie di segnale

mitogeniche ed antiapoptotiche che potrebbero portare ad una trasformazione in senso neoplastico della cellula. (Ren R. 2005; Okuda et al., 2005). La regolazione di tali proteine può avvenire sia tramite meccanismi autoinibitori che grazie all'azione di altre molecole.

L'autoinibizione è data da diverse interazioni intramolecolari che coinvolgono: i domini SH2 e SH3, la regione di connessione tra questi domini, la regione tra il dominio SH2 e quello chinamico e la regione "cap" a cui appartengono i primi ottanta amminoacidi della sequenza proteica di Abl e di Arg codificata dall'esone 1 e da parte dell'esone 2 (Hantschel et al., 2004). Se quest'ultima regione viene deleta si verifica nella cellula un aumento dei livelli totali di fosfotirosina, di autofosforilazione e dell'attività chinamica in vitro (Pluk et al., 2002). Studi di predizione della struttura secondaria della regione "cap" di Abl e di Arg mettono in evidenza che questa sequenza amminoacidica non possiede un avvolgimento definitivo già allo stato nativo, ma che lo raggiunge solo a seguito di determinati eventi biologici; l'acquisizione di una diversa struttura secondaria da parte della regione "cap" potrebbe essere determinante per una diversa regolazione dell'attività chinamica delle due proteine (Buffa et al., 2007). Inoltre è stato dimostrato che i domini SH2 e SH3 di Arg e Abl sono in grado di stabilire delle interazioni intramolecolari che mantengono il dominio chinamico nella conformazione inattiva (Nagar et al., 2003): il dominio SH2 si interfaccia in maniera stretta con la regione C-terminale del dominio chinamico, impedendo così l'accesso al dominio SH2 stesso e occludendo il sito di legame al dominio chinamico. Il legame di peptidi fosforilati al dominio SH2 di Abl autoinibito distrugge l'interazione SH2-dominio chinamico e, probabilmente, determina l'attivazione della chinasi (Nagar et al., 2003).

L'ancoraggio al dominio chinamico da parte del dominio SH3, invece, sembra essere direttamente regolato da locali eventi di fosforilazione (Hantschel et al., 2004). In particolare il dominio SH3 lega il motivo PXXP, che si trova a cavallo del dominio chinamico e di SH2; nel motivo PXXP di Abl la seconda prolina è sostituita da una tirosina fosforilabile (Y245). Se il residuo Y245 è mutato, l'attivazione dovuta all'autofosforilazione di Abl è inibita del 50% (Brasher et al., 2000).

L'attivazione di recettori di membrana, come il PDGFR (Platelet-Derived growth factor receptor), aumenta l'attività chinamica di Abl e Arg da tre a quattro volte nei fibroblasti (Plattner et al., 1999 e 2004). Un possibile modello che descriva l'attivazione di Abl e Arg da parte dei recettori di membrana prevede l'autofosforilazione del recettore a seguito del legame con il relativo ligando, le regioni fosforilate del recettore richiamano

quindi i domini SH2 e SH3 di Abl e Arg portando alla liberazione del dominio chinasi (Hernandez et al., 2004). È stato inoltre evidenziato che, quando il PDGFR lega il suo ligando e si ha autofosforilazione, la tirosina chinasi non recettoriale Src è in grado di legarsi ai residui di tirosina fosforilati del recettore stesso (Plattner et al., 2004) e di fosforilare Arg nella tirosina in posizione 439 (Tyr439). Questa tirosina, che in Abl corrisponde alla Tyr412, fa parte del loop di attivazione del dominio chinasi di Arg e la sua fosforilazione favorisce il passaggio della proteina nella conformazione attiva (Hernandez et al., 2004a). Inoltre, è stato da poco dimostrato che il PDGFR è in grado di attivare direttamente sia Abl che Arg per fosforilazione rispettivamente sulla Tyr 245 e sulla Tyr 271, entrambe localizzate nel dominio SH3 (Srinivasan et al., 2009).

Un altro modello di attivazione di Arg prevede invece l'interazione tra i recettori di adesione e le molecole della matrice extracellulare. Questo legame indurrebbe la dimerizzazione delle proteine recettoriali con conseguente reclutamento delle molecole di Arg che, per interazione dei domini SH2 e SH3 con il recettore dimerizzato, si attiverebbero mediante un meccanismo di fosforilazione (Hernandez et al., 2004a). In questo caso i recettori di membrana utilizzerebbero Arg come collegamento tra l'ambiente extracellulare e il citoplasma; Arg, infatti, è necessario per esempio per stimolare la crescita e la ramificazione dei neuriti in neuroni corticali piastrati su laminina-1 (Moresco et al., 2005).

FUNZIONI DI ARG

Ruolo di Arg nella neuritogenesi

Da studi genetici, effettuati in embrioni di *Drosophila* e di topo, è emerso che le proteine Arg ed Abl hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo e nelle funzioni del sistema nervoso centrale. Infatti è stato osservato che per effetto del *knock-out* genico o della perdita delle funzioni chinasiche di queste proteine lo sviluppo neurologico viene influenzato in modo negativo (Hernandez et al., 2004a). D-Abl ha un'elevata espressione sia nel sistema nervoso centrale (SNC) embrionale dove regola la genesi assonale, sia nel tessuto epiteliale dove controlla la morfogenesi e il movimento delle cellule epiteliali. Nel topo, invece, Abl e Arg sono espresse a livello sia dei neuroni embrionali che del tessuto nervoso adulto. Nel SNC di topo Arg è sovraespresso (Perego et al., 1991) e la sua espressione è cinque volte maggiore rispetto a quella di Abl (Moresco et al., 2003). I topi *knock-out* per il gene Arg (genotipo *arg -/-*) si sviluppano normalmente ma mostrano diverse anomalie comportamentali, come l'aumentata tendenza al movimento retrogrado e la ridotta capacità di superare un ostacolo, causate da difetti nelle funzioni neuronali (Koleske et al., 1998). Questi risultati, insieme all'osservazione che Arg è espresso principalmente a livello delle sinapsi e dei neuriti (Koleske et al., 1998), hanno suggerito un possibile ruolo di Arg nella regolazione della trasmissione nervosa. Arg potrebbe infatti essere implicato nella fosforilazione di proteine sinaptiche, come i canali ionici, i quali sono in grado a loro volta di regolare il meccanismo di rilascio dei neurotrasmettitori (Moresco et al., 2003b), oppure Arg potrebbe essere coinvolto nei pathway intracellulari di trasduzione del segnale che si attivano nei neuroni in risposta a cambiamenti chimici o fisici dell'ambiente extracellulare (Koleske et al., 1998). È stato inoltre osservato che in topi *arg -/-* le arborizzazioni dendritiche in neuroni piramidali CA1 si sviluppano normalmente ma regrediscono con la crescita rispetto ai controlli. Questo causa una diminuita funzione ippocampale misurabile tramite la valutazione della tendenza innata dei roditori ad esplorare nuovi oggetti posti in un ambiente familiare (Sfakianos et al., 2007).

A differenza dei topi *arg -/-*, gli embrioni di topi *knock-out* sia per Abl che per Arg (*abl -/- arg -/-*) muoiono 11 giorni post-coitum. Il terzo rostrale del tubo neurale di questi

topi si presenta ancora aperto ed è presente una percentuale elevata di cellule apoptotiche in tutti i tessuti (Koleske et al., 1998); in questi embrioni sono inoltre presenti diversi difetti nella neuritogenesi, forse dovuti ad alterazioni citoscheletriche. Infatti Arg ed Abl, nelle cellule neuroepiteliali, colocalizzano sulla rete apicale di actina regolando, attraverso i domini di legame alla F-actina presenti nella loro regione carbossi-terminale, la neuritogenesi (Koleske et al., 1998). Inoltre nelle cellule neuroepiteliali degli embrioni doppi *knock-out*, la rete apicale di actina è disorganizzata e sulla superficie basolaterale si formano strutture ectopiche ricche di actina. Questi risultati fanno pensare a una possibile ridondanza di funzione tra Abl ed Arg nello sviluppo del sistema nervoso.

I meccanismi attraverso cui Arg può promuovere i riarrangiamenti citoscheletrici importanti anche per la neuritogenesi sono diversi:

1) Arg può fosforilare p190Rho-GAP

RhoA (Rho), Rac1 (Rac) e Cdc42 sono i membri della sottofamiglia Rho delle GTPasi e regolano i riarrangiamenti citoscheletrici in risposta a segnali extracellulari. Questi segnali sono riconosciuti da recettori di superficie e vengono trasmessi alle GTPasi Rho attraverso due classi di proteine regolatorie: le GEF (guanine-nucleotide exchange factors), le quali promuovono lo scambio di GDP con GTP attivando quindi le GTPasi e le GAP (GTPase activating protein), proteine che stimolano l'idrolisi del GTP. E' stato osservato che Arg è in grado di inibire Rho stimolando l'attività del suo inibitore p190RhoGAP attraverso la fosforilazione della tirosina in posizione 1105 (Hernandez et al., 2004a). Inoltre la fosforilazione di p190RhoGAP da parte di Arg promuove la formazione del complesso p190RhoGAP/p120RasGAP, che si traduce, a sua volta, in un incremento dell'attività di p190RhoGAP (Bradley et al., 2006); a conferma di ciò in neuroni ippocampali di topi *arg -/-* non solo è ridotta la fosforilazione di p190RhoGAP, ma anche la sua associazione a p120RasGAP (Sfakianos et al., 2007). L'inibizione di Rho da parte di p190RhoGAP è necessaria per garantire la corretta formazione di fasci di actina e la genesi assonale nel tessuto nervoso di *Drosophila* e di topo in fase di sviluppo e per il mantenimento delle spine e arborizzazioni dendritiche (Sfakianos et al., 2007). Nei neuroni Rho ha in generale un effetto inibitorio sul prolungamento degli assoni e dei dendriti, è stato infatti osservato che l'inibizione della sua attività nella

linea cellulare di neuroblastoma N2A stimola la formazione dei processi neuronali (Hernandez et al., 2004b).

Inoltre in cellule N2A è stato dimostrato che Arg è in grado di indurre la formazione di processi neuritici attraverso la stimolazione di p190RhoGAP (Hernandez et al., 2004b). In queste cellule la cotrasfezione di p190RhoGAP e Rho causa un'inibizione dell'attività di Rho del 65% rispetto ai livelli controllo; la cotrasfezione di Arg e di p190RhoGAP riduce ulteriormente l'attività di Rho fino al 6% rispetto ai livelli controllo. Inoltre, nelle stesse cellule, la tirosina chinasi Arg da sola non è in grado di influenzare l'attività di Rho, ma stimola in ogni caso la neuritogenesi. Questi risultati confermano il ruolo di p190RhoGAP come importante mediatore del segnale di Arg nelle cellule neuronali, ma lasciano supporre che Arg attivi anche un pathway neuritogenico p190RhoGAP-indipendente (Hernandez et al., 2004b).

Non è chiaro come la fosforilazione mediata da Arg di p190RhoGAP possa influenzare la conformazione e i movimenti cellulari, nelle diverse fasi di sviluppo cerebrale nel topo. Arg è espresso principalmente nei neuroni e il picco di fosforilazione di p190RhoGAP si verifica due-tre settimane dopo la nascita. Questo può essere spiegato dal fatto che Arg può modulare l'attività di p190RhoGAP nella fase tardiva dello sviluppo cerebrale, ovvero quando intervengono l'elaborazione dei processi assonali e dendritici e la formazione delle sinapsi (Hernandez et al., 2004a).

2) Arg può interagire direttamente con i filamenti di actina e con i microtubuli

Studi effettuati su neuroni corticali di ratto in coltura hanno dimostrato che l'over-espressione della forma wild-type di Abl e l'espressione della sua forma costitutivamente attiva causano rispettivamente un'incremento nella formazione di spine dendritiche (Woodring et al., 2002) e di neuriti (Zukerberg et al., 2000).

Arg over-espresso in fibroblasti promuove la formazione di protrusioni periferiche ricche di filamenti di actina e microtubuli, attraverso delle interazioni dirette mediate dai due domini di legame alla F-actina e dal dominio di legame ai microtubuli (Wang et al., 2001). Anche un frammento di Arg formato dalla sola porzione carbossi-terminale e privo del dominio chinasi è sufficiente per la formazione di tali protrusioni (Wang et al., 2001). È stato osservato che il primo dominio di legame alla F-actina è identico per

il 28% al motivo I/LWEQ della talina dei vertebrati e che il secondo presenta una percentuale di identità del 27% con il dominio CH (calponin homology) della spettrina e della fimbrina. Una molecola di Arg può quindi legare in modo cooperativo due molecole di actina. I due domini I/LWEQ e CH legano l'actina in modo differente e introducono diverse modificazioni strutturali nei filamenti di actina: con il dominio I/LWEQ Arg ne chiude la tasca di legame ai nucleotidi e con il dominio CH forma dei "ripiegamenti" all'interno dei filamenti di actina. Queste alterazioni strutturali si propagano lungo tutto il filamento di actina e impediscono il contemporaneo legame dei due domini I/LWEQ e CH di Arg a diverse molecole di uno stesso filamento. Ciò consente la formazione di fasci di F-actina mediata dal legame di una molecola di Arg a due distinti filamenti di actina (Galkin et al., 2005).

Da questi risultati emerge che Arg può agire come una *scaffolding protein* per organizzare la struttura citoscheletrica all'interno della cellula, sfruttando le attività di formazione di fasci di F-actina e di *crosslinking* tra l'F-actina e i microtubuli (Hernandez et al., 2004a).

3) Arg può fosforilare le proteine della famiglia Ena/VASP

Le proteine della famiglia Ena/VASP includono *Drosophila Enabled* (Ena), *C-Elegans Enabled* (Unc-34) e il loro omologo nei mammiferi (Mena), la proteina VASP (vasodilator-stimulated-phosphoprotein) e la proteina Ena/VASP-like. Queste proteine sono in grado di indurre la polimerizzazione delle molecole di actina attraverso l'inibizione delle *capping proteins* che a loro volta bloccano la crescita delle estremità positive dei filamenti di actina. L'interazione tra Mena e Arg può essere mediata dalle proteine adattatrici Abi-1 e Abi-2 (Abelson-interactor protein 1 e 2) tramite il legame del dominio SH3 delle chinasi Abl e Arg alle sequenze ricche di prolina all'N-terminale di Abi, e tramite il legame del dominio SH3 di Abi che lega il terzo dominio conservato PXXP di Abl e Arg (Hernandez et al., 2004a). Le proteine Abi stabiliscono così un ponte molecolare tra le chinasi della sottofamiglia Abl e la proteina Mena favorendo la fosforilazione Abl-dipendente di Mena. Non è ancora chiaro come queste modulino l'attività delle proteine della famiglia Ena/VASP, tuttavia studi genetici effettuati su *Drosophila* indicano che D-Abl inibisce l'attività di Ena durante il prolungamento

assonale e in topi *knock-out* per Mena si osserva un'irregolare morfogenesi neuronale (Moresco et al., 2003).

Ruolo di Arg a livello postsinaptico nell'assemblaggio della giunzione neuromuscolare

Arg ed Abl vengono attivati sulla membrana post-sinaptica della giunzione neuromuscolare in seguito all'attivazione dei recettori MuSK (muscle-specific receptor tyrosine kinase) da parte dell'agrina, una glicoproteina di circa 140 kDa che viene secreta dai motoneuroni che si concentra nello spazio intersinaptico. L'agrina, interagendo con i recettori MuSK recluta i recettori per l'acetilcolina (AChRs) sulla membrana post-sinaptica della giunzione neuromuscolare. MuSK ha un'attività tirosino chinasi intrinseca e inoltre a seguito dell'interazione con l'agrina viene fosforilato dalle chinasi Abl su diversi residui di tirosina. Questa attività di fosforilazione reciproca ha diverse implicazioni meccanicistiche a livello della giunzione neuromuscolare. In primo luogo la fosforilazione di MuSK crea nuovi siti di legame fosfotirosinici per la formazione di un più grande complesso di trasduzione del segnale, aumenta l'attività catalitica del recettore stesso e facilita in questo modo la capacità di attivazione di target, compresi Arg ed Abl. Inoltre la fosforilazione delle chinasi Abl da parte del recettore MuSK può incrementarne l'attività chinasi promuovendo la fosforilazione di proteine sinaptiche e di effettori della regolazione citoscheletrica. Infine, il reclutamento di Abl e Arg da parte di MuSK porta alla formazione di fasci di actina a livello postsinaptico, i quali potrebbero stabilizzare la formazione dei cluster di recettori per l'acetilcolina (Finn et al., 2003).

Ruolo di Arg nei meccanismi di migrazione e adesione cellulare

Le tirosino chinasi della famiglia Abl sono coinvolte anche nella regolazione della morfologia e della motilità cellulare (Pendergast, 2002; Hernandez et al., 2004a). In particolare Arg inibisce il processo di migrazione cellulare attraverso la distruzione del

complesso proteico Crk-CAS (Kain et al., 2001). Crk è una proteina associata alle adesioni focali e appartiene alla famiglia di molecole adattatrici contenenti i domini SH2 e SH3, mediante i quali interagisce con proteine effettrici come p130^{CAS} (CAS); gli amminoacidi tirosinici fosforilati di CAS legano, infatti, il dominio SH2 di Crk e, in questo modo, si viene a formare il complesso Crk-CAS (Hernandez et al., 2004a). L'associazione tra Crk e CAS induce la migrazione cellulare in risposta a segnali indotti dalle citochine o dall'adesione dei recettori integrinici alla matrice extracellulare mediante l'attivazione della proteina Rac, appartenente alla famiglia delle RhoGTPasi. Se Abl e Arg sono attivate, fosforilano la proteina Crk a livello del residuo tirosinico in posizione 221 (Y221) determinando un'alterazione conformazionale che rompe il legame alla proteina effettrice CAS. Infatti il dominio SH2 di Crk forma un legame intramolecolare con la Y221 e non può, quindi, riconoscere altre proteine fosforilate in tirosina.

E' stato osservato, inoltre, che fibroblasti di topi *knock out* per Abl e per Arg (*abl*^{-/-} *arg*^{-/-}) mostrano un'accentuata abilità migratoria rispetto alle cellule *wild-type* (Kain et al., 2001). Saggi di *wound healing* hanno consentito di esaminare gli effetti della ri-espressione di Arg sulla migrazione cellulare evidenziando una riduzione nella velocità e entità di migrazione rispetto al controllo. Inoltre ad un aumento dei livelli di espressione di Arg corrisponde una diminuzione sia della densità che della dimensione delle adesioni focali; tale fenomeno è accompagnato da una distribuzione periferica e corticale della F-actina e da una conseguente riduzione delle *stress fibers*. Allo stesso modo è stato osservato che nei fibroblasti *arg*^{-/-} transfettati con Arg-YFP la contrattilità cellulare tende a diminuire. Il dominio chinasi di Arg sembra essere determinante sia per la diminuzione della contrattilità cellulare che per l'attenuazione delle *stress fibers* (Peacock et al., 2007). Il modello più aggiornato che descriva simultaneamente l'azione di Arg su Rho e sulle fibre di F-actina prevede che durante la migrazione su superfici adesive Arg, localizzato al *leading edge* della cellula, inibisca Rho attraverso l'attivazione di p190RhoGAP. Tale inibizione si manifesta con la distruzione delle *stress fibers* e la riduzione della contrattilità cellulare: l'actina viene polimerizzata a ridosso della membrana nel *leading edge* che può così distendersi. E' probabile che la localizzazione di Arg al *leading edge* comporti una diminuzione dei livelli di Arg al *trailing edge*, dove Rho non risulta quindi più inibito. Arg potrebbe, dunque, svolgere un duplice ruolo tramite la regolazione di Rho per mezzo di p190RhoGAP: 1) attenuare la contrattilità, riducendo la formazione delle *stress fiber* e delle adesioni focali per

permettere alla cellula di esplorare lo spazio ad essa circostante al *leading edge*; 2) indurre la contrattilità e promuovere la formazione delle *stress fiber* per consentire alla cellula di trascinarsi lungo la superficie di adesione al *trailing edge* (Peacock et al., 2007). Arg ha un ruolo nella regolazione della motilità cellulare anche mediante interazione con la cortactina. La cortactina è una proteina capace di legare la F-actina ed è un substrato di diverse tirosino chinasi. Per queste due caratteristiche è considerata una molecola ponte che collega da una parte i segnali meccanici provenienti dai recettori di membrana e dall'altra il citoscheletro di actina; si presenta, quindi, come una proteina chiave per la coordinazione delle dinamiche che interessano la membrana plasmatica e il rimodellamento del citoscheletro (Cosen-Binker et al., 2006). È stato dimostrato, tramite saggi di microarray di proteine, che la cortactina è un substrato di Abl e Arg. Fibroblasti di topo 3T3 arg^{-/-} e/o abl^{-/-}, trattati con PDGF, mostrano una significativa riduzione se non addirittura una perdita totale della fosforilazione in tirosina della cortactina rispetto alle cellule wt. Se i vettori Abl-YFP o Arg-YFP *full length* vengono transfettati negli stessi fibroblasti, viene recuperata la capacità di fosforilazione della cortactina a seguito del trattamento con PDGF (Boyle et al., 2007). Sempre nelle cellule 3T3 wt e/o abl^{-/-} arg^{-/-}, trattate con PDGF, è stato transfettato il vettore cortactina-RFP; solo nelle cellule wt è possibile osservare che le *stress fiber* vengono distrutte e che la F-actina si localizza a ridosso della membrana plasmatica; quest'ultima, inoltre, va a formare con la cortactina delle strutture actiniche circolari chiamate *dorsals waves*. Anche la cortactina modifica la sua localizzazione citoplasmatica; si sposta, infatti, dalla zona perinucleare per accumularsi nelle *dorsals waves*. Tale fenomeno non si verifica nei mutanti abl^{-/-} arg^{-/-} o in cellule trattate con STI571 (una piccola molecola che inibisce le tirosino chinasi della famiglia Abl bloccando l'accesso dell'ATP al dominio chinamico). Ciò significa che l'attività chinamica di Abl e Arg è necessaria per la traslocazione della cortactina, la sua fosforilazione e, quindi, la formazione delle *dorsals waves* (Boyle et al., 2007). Inoltre recentemente è stato dimostrato che Arg e la cortactina interagiscono alla periferia cellulare e da esperimenti di pull-down si è scoperto che questa interazione si instaura tra il dominio SH3 della cortactina che lega il primo dei motivi ripetuti PXXP di Arg. In fibroblasti 3T3 l'adesione su fibronectina causa la fosforilazione della cortactina da parte di Arg che porta alla creazione di un sito di legame per il dominio SH2 di Arg stesso. La mancata fosforilazione della cortactina da parte di Arg e, di conseguenza la mancanza del suo legame alla cortactina fosforilata compromette in

maniera significativa la formazione di protrusioni cellulari adesione dipendenti. Questi dati dimostrano che il legame tra Arg e la cortactina e la fosforilazione di quest'ultima sono indispensabili per la formazione di protrusioni cellulari adesione dipendenti (Lapetina et al., 2009).

Arg e la regolazione del proteasoma

Il proteasoma è un complesso multimerico costituito da molecole deputate all'assemblaggio del proteasoma stesso e da molecole dotate di attività proteolitica. Gli enzimi dell'ubiquitinazione modificano le proteine cellulari in modo che queste vengano riconosciute e degradate dal proteasoma. La proteolisi mediata dal proteasoma costituisce un importante meccanismo di regolazione durante lo sviluppo embrionale, il differenziamento cellulare, le transizioni di fase del ciclo cellulare, la regolazione trascrizionale e l'apoptosi (Liu et al., 2006). Tramite saggi di immunoprecipitazione è stato dimostrato che Abl e Arg si associano tramite i loro domini SH2 e SH3 a PSMA7, una delle subunità del proteasoma responsabili del suo assemblamento, e che questa associazione è in parte dovuta all'attività chinasi di Abl ed Arg. PSMA7 è, inoltre, un substrato di Abl e di Arg il cui effetto immediato è l'inibizione dell'attività di degradazione da parte del proteasoma (Liu et al., 2006).

Ruolo di Arg nello stress ossidativo

Le tirosino chinasi Arg e Abl giocano un ruolo anche nella risposta cellulare allo stress ossidativo. La forma citoplasmatica di Abl viene attivata in risposta all' H_2O_2 attraverso un meccanismo dipendente dalla proteina chinasi C δ : Abl viene trasferito all'interno dei mitocondri dove induce una caduta del potenziale transmembrana (Kumar et al., 2001), a cui si associa il rilascio del citocromo C e l'induzione dell'apoptosi (Su et al., 2000). L'attivazione di Arg, invece, media la risposta cellulare allo stress ossidativo attraverso la fosforilazione della proteina pro-apoptotica SIVA-1 (Cao et al., 2001). È stato inoltre dimostrato che in risposta a diversi agenti ossidanti (ROS, TNF- α e menadione) viene indotta la formazione di eterodimeri Abl/Arg e la conseguente fosforilazione di Arg da parte di Abl. Il dominio SH3 di Abl si lega ad un sito ricco in prolina (aminoacidi 567-

576) situato nella regione carbossi-terminale di Arg (Cao et al., 2003a). A loro volta, per effetto degli stessi stimoli, Abl e Arg interagiscono, attraverso il dominio SH3 con il sito PFNP (aminoacidi 293-296) della catalasi, un enzima tetramerico che catalizza la reazione di conversione dell' H_2O_2 in H_2O e O_2 all'interno dei perossisomi. La conseguente fosforilazione sui residui di Tyr231 e Tyr386 della catalasi stimola l'attività catalitica dell'enzima. Fibroblasti di embrione di topo privi di Abl e di Arg, mostrano un incremento dei livelli di H_2O_2 , dovuto ad una diminuzione del processo di degradazione dell' H_2O_2 . In tali cellule si osserva anche una resistenza all'induzione dell'apoptosi mediata dall'accumulo intracellulare di H_2O_2 ; e tale difetto viene corretto ripristinando l'espressione di Arg (Cao et al., 2003b). Arg gioca infatti un doppio ruolo nella risposta allo stress ossidativo: a basse concentrazioni di ROS (0.25-1.0 mM H_2O_2) svolge una funzione protettiva mediata dall'attivazione della catalasi e dalla regolazione dei livelli di sostanze ossidanti; se invece la concentrazione di ROS diventa incontrollabile (2 mM H_2O_2) Arg agisce come effettore della risposta apoptotica. L'apoptosi viene indotta da Arg per inibizione dell'attività della catalasi attraverso due diversi meccanismi. Il primo prevede la dissociazione degli eterodimeri Abl/Arg e la defosforilazione della Tyr231 e della Tyr386 della catalasi ad opera di tirosino-fosfatasi. Il secondo invece implica la fosforilazione di tali residui tirosinici da parte di Abl e Arg e l'ubiquitinazione della proteina per la successiva degradazione proteasomica (Cao et al., 2003c).

Arg interagisce anche con GPx1, la forma citosolica/mitocondriale dell'enzima glutatione perossidasi. Come per la catalasi la fosforilazione di questo enzima causa, a concentrazioni basse di ROS, un incremento dell'attività catalitica; concentrazioni elevate di sostanze ossidanti, invece, causano la distruzione del complesso Arg/GPx1 e l'induzione dell'apoptosi (Cao et al., 2003d).

Studi recenti effettuati sulla linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7 indicano che la fosforilazione di Arg sul residuo di Tyr261 in risposta al trattamento con H_2O_2 0.1 mM induce la stabilizzazione della proteina e che questo processo è favorito dalla formazione di eterodimeri Abl/Arg e di omodimeri Arg/Arg. La Tyr261 rappresenta quindi sia un substrato di Abl che un sito di autofosforilazione. Di contro, l'esposizione delle cellule ad H_2O_2 1mM riduce i livelli di fosforilazione di Arg e ne promuove l'ubiquitinazione; questo evento è associato ad una inibizione della formazione dei dimeri di Arg. La via di degradazione proteasomica di Arg può rappresentare quindi un

ulteriore meccanismo di induzione dell'apoptosi in presenza di elevate concentrazioni di sostanze ossidanti (Cao et al., 2005).

Lo stress ossidativo ha un ruolo chiave anche nello sviluppo di alcune patologie, come per esempio quelle neurodegenerative e in particolare nell'Alzheimer, una patologia caratterizzata da un declino cognitivo causato da morte neuronale, preceduta da disfunzione sinaptica, assonopatia e retrazione dendritica. Una delle cause principali di questa neurodegenerazione è la formazione di depositi di placche amiloidee, costituite dal peptide amiloidogeno A β (Abeta) (Yankner et al., 2000, Hardy et al., 2002). Questo peptide deriva dal taglio proteolitico, da parte della β - e γ -secretasi, di un recettore di membrana APP (amyloid precursor protein). Esistono due forme di Abeta: un peptide di 40 amminoacidi Abeta (1-40), che è il prodotto predominante in condizioni fisiologiche e un peptide più lungo, più citotossico e maggiormente predisposto all'aggregazione Abeta (1-42). Quest'ultimo *in vitro* a seconda del tempo di incubazione, della concentrazione, della temperatura, della forza ionica e del pH è in grado di dare origine a specie strutturalmente distinte tra cui oligomeri e fibrille. Recentemente è stato riportato che gli oligomeri sono circa 10 volte più neurotossici delle fibrille le quali a loro volta sono circa 40 volte più neurotossiche del peptide non aggregato (Dahlgren et al., 2002). Il meccanismo attraverso cui Abeta(1-42) è in grado di causare stress ossidativo e neurotossicità non è ancora chiaro, dati in letteratura però indicano un ruolo di Abl nella degenerazione indotta da fibrille di Abeta. In particolare è stato dimostrato che, in seguito all'iniezione di fibrille di Abeta nell'ippocampo di ratto, si ha attivazione di Abl con conseguente aumento della fosforilazione e quindi dell'attività dell'isoforma pro-apototica di p73 (Alvarez et al., 2004). Inoltre studi più recenti hanno dimostrato che, in modelli animali di Alzheimer, si ha una ridotta neurodegenerazione indotta dal trattamento con fibrille di Abeta in seguito a somministrazione di STI571, inibitore di entrambe le tirosino chinasi della famiglia Abelson (Cancino et al., 2008).

È stato anche dimostrato che la proteina precursore APP è fosforilata in tirosina nelle cellule che esprimono una forma costitutivamente attiva di Abl (Zambrano et al., 2001) e che quest'ultimo forma un complesso con Fe65 e APP stessa. Fe65 può legare contemporaneamente APP, attraverso il suo dominio PTB2, e Abl, attraverso il suo dominio WW, portando alla formazione di un complesso eterotrimerico. Come conseguenza di questa interazione Abl si trova a stretto contatto con il dominio intracellulare di APP e questo può favorirne la fosforilazione che porta al taglio proteolitico della stessa ed il rilascio intracellulare della sua porzione C-terminale con

conseguente trasduzione del segnale e attivazione dei geni responsivi (Perkinton et al., 2004). La somiglianza strutturale e la ridondanza di funzione nello sviluppo del sistema nervoso tra Arg e Abl e il coinvolgimento di Arg nei meccanismi indotti dallo stress ossidativo fanno ipotizzare quindi anche un ruolo di Arg nella tossicità indotta da Abeta.

Recentemente inoltre è stato dimostrato che se somministrata a basse concentrazioni (25nM) Abeta è in grado di indurre, in colture primarie di neuroni di ratto, la formazione di protrusioni cellulari simil-neuritiche. Anche se il meccanismo attraverso cui Abeta è in grado di esercitare il suo effetto neurotrofico non è ancora chiaro questo avviene per attivazione del recettore p75 e verosimilmente per inibizione di Rho (Susen and Blochl, 2005). Questi dati rappresentano un possibile punto di partenza per studi futuri che mirino a definire il possibile coinvolgimento di Arg in virtù della sua capacità di attivare l'inibitore di Rho, p190RhoGAP.

Potenziale oncogeno di Arg

Esperimenti condotti su fibroblasti di topo NIH 3T3 hanno dimostrato che la proteina Gag-Arg, a differenza di Gag-Abl, non ha attività trasformante (Wang et al., 1996). Inoltre l'attivazione oncogena di Abl può avvenire per delezioni o mutazioni nella sua regione SH3 (Cao et al., 2001), mentre in Arg tali modificazioni non ne attivano il potenziale oncogeno (Wang et al. 1996). E' invece la perdita della regione carbossi-terminale della proteina Gag-Arg ad associarsi all'acquisizione della attività trasformante (Mysliwiec et al., 1996) e delezioni di questo dominio sono anche sufficienti per attivare oncogenicamente Abl (Tybulewicz et al., 1991). Possiamo quindi affermare che la regione carbossi-terminale sia di Arg che di Abl esercita una funzione negativa sulla proliferazione cellulare. Tale funzione è probabilmente mediata dall'interazione delle sequenze ricche in prolina PXXPXK/R di Arg con le regioni SH3 di diverse proteine citoplasmatiche (Wang et al., 1996).

ARG è coinvolto in una traslocazione cromosomica con il gene ETV6 (Cazzaniga et al., 1999; Iijima et al., 2000; Griensinger et al., 2002). ETV6 è un gene che appartiene alla famiglia ETS dei fattori di trascrizione ed è stato inizialmente identificato come partner di fusione del gene per il recettore β del fattore di crescita delle piastrine (PDGFR β) in una leucemia cronica mielomonocitica con traslocazione t(5;12)(q33;p13). ETV6 è

anche coinvolto in altre traslocazioni presenti in varie leucemie umane e spesso ETV6 si fonde con tirosino chinasi come Jak2, Abl e Ntrk3. In caso di traslocazione queste proteine di fusione hanno un'attività tirosino chinasi costitutiva che accelera la progressione nel ciclo cellulare delle cellule ematopoietiche traslocate.

La traslocazione t(1;12) che dà luogo a ETV6/ARG è la prima che vede ARG coinvolto in una neoplasia umana (figura 4). Infatti il trascritto è stato trovato, tramite 3' RACE-PCR, in tre pazienti affetti rispettivamente da leucemia mieloide acuta di tipo M4, M3 e linfoide acuta LLA, (Cazzaniga et al., 1999; Iijima et al., 2000; Griensinger et al., 2002). In questi pazienti sono stati trovati anche i trascritti reciproci (Arg/Etv6), ma con livelli di espressione decisamente ridotti (Okuda et al., 2001).

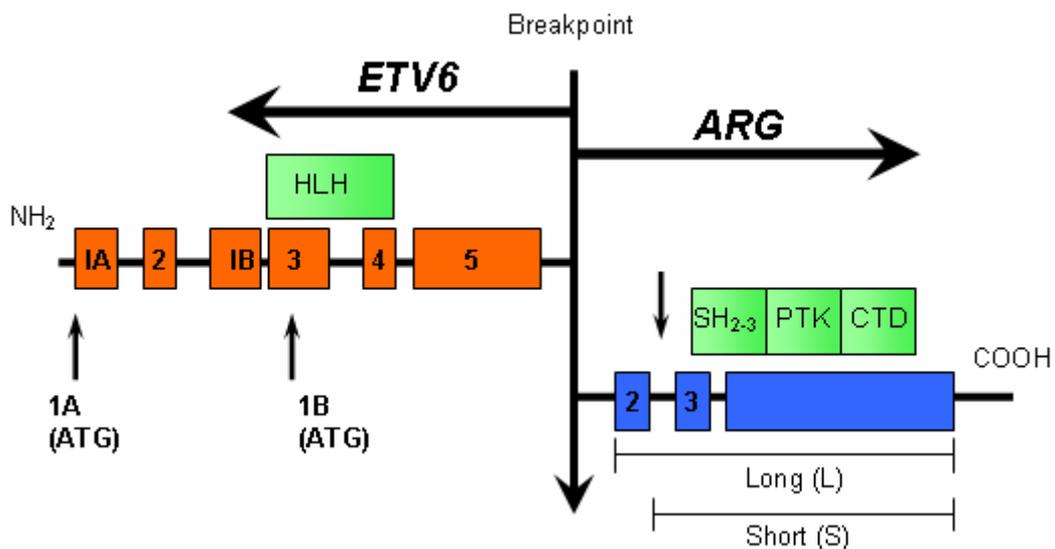


Figura 4: Rappresentazione schematica del gene di fusione ETV6/ARG.

Le frecce indicano le 3 zone di splicing che danno origine alle 4 forme del gene di fusione ETV6/ARG. Gli esoni di ETV6 sono di colore arancione mentre quelli di ARG sono in blu. ETV6 può avere come primo esone IA o IB.

I domini funzionali sono rappresentati da quadrati localizzati sopra gli esoni corrispondenti e sono: HLH (helix loop helix) per il gene ETV6, SH3-2, TPK (tirosin Kinasi) e CTD (dominio carbossi-terminale) per ARG.

Nella linea cellulare HT93A, ottenuta dal paziente con leucemia AML-M3 t(1;12), positiva portatore anche della traslocazione t(15;17)(q22;q11.2), sono stati identificati

quattro tipi di trascritti ETV6/ARG, originati per splicing alternativo (Iijima et al., 2002) e definiti:

- ✓ ETV6/ARG-AS
- ✓ ETV6/ARG-AL
- ✓ ETV6/ARG-BS
- ✓ ETV6/ARG-BL

Le forme B di ETV6 hanno il dominio HLH (Helix Loop Helix) troncato, mentre le forme A possiedono la coding sequence completa. Le forme S (short) di Arg mancano di 21 amminoacidi corrispondenti all'esone II mentre le forme L (long) mantengono queste sequenze. Da uno studio recente è emerso che tra i trascritti di fusione l'unico in grado di promuovere crescita cellulare IL-3 indipendente nella linea cellulare ematopoietica di topo Ba/F3 e la crescita ancoraggio indipendente in fibroblasti di topo è la forma completa di tutti i domini funzionali ossia la ETV6/ARG-AL (Iijima et al., 2002). Una possibile spiegazione a questo fenomeno sembra essere la capacità del gene di fusione di stimolare la produzione di IL-3 (Livak et al., 2001), anche se non è ancora chiaro come la sequenza di 21 amminoacidi, codificati dall'esone II di Arg, riesca a conferire alla proteina di fusione ETV6/ARG-AL questa proprietà dato che non ci sono particolari domini funzionali noti in questa sequenza.

Recentemente (Okuda et al., 2005) sono stati condotti degli studi per cercare di capire il meccanismo molecolare alla base delle proprietà oncogeni che del prodotto di fusione ETV6/ARG. Tramite studi su mutanti caratterizzati da delezioni del costrutto ETV6/ARG è stato scoperto che il dominio SH₂ e il dominio C-terminale di Arg, così come il dominio PNT (pointed domain) di ETV6, sono richiesti per l'attività della tirosina chinasi ETV6-ARG, supportando l'idea che la dimerizzazione o l'oligomerizzazione siano indispensabili per l'attività oncogenica di Arg. Inoltre è stato dimostrato anche che esiste un legame diretto tra ETV6/ARG e la proteina BRG2 nel sito PNT di ETV6 e che questo causa l'inizio di una traduzione del segnale che porta all'attivazione del pathway di Ras.

Dal momento che la localizzazione cellulare delle proteine ETV6 ed Arg è distinta si è indagato circa la localizzazione della proteina di fusione, la quale si trova nel citoplasma e lega due filamenti di actina al C-terminale di Arg indicando un possibile ruolo di rimodellamento del citoscheletro responsabile del meccanismo oncogeno di

ETV6/ARG, anche se la capacità di generare protrusioni cellulari è presente solo nel caso in cui venga over-espresso Arg wild type.

Arg sembra essere anche coinvolto nella genesi del carcinoma colonrettale, o quantomeno, nella sua progressione da adenoma a carcinoma metastatizzante (Chen et al., 1999). Da uno studio di espressione, utilizzando la tecnica dei microarray, è emerso che il trascritto di Arg è espresso in modo differenziale rispetto al tessuto sano anche nel carcinoma gastrico (Liu et al., 2002). Risultati simili sono stati ottenuti dal confronto tra cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale (Crnogorac et al., 2002), di carcinoma alla vescica (Lu et al., 1997) e di carcinoma alla mammella (Meric et al., 2002) e le corrispettive controparti sane. Un incremento dei livelli di espressione di Arg è stato descritto anche nello stadio avanzato invasivo (stadio IV) del timoma, neoplasia delle cellule epiteliali del timo (Sasaki et al., 2004).

Recentemente è stato scoperto che nel cancro alla mammella le chinasi della famiglia Abelson agiscono a valle dei pathways di ErbB e di Src nell'indurre l'invasione cellulare e la meta statizzazione; in particolare l'attivazione costitutiva delle chinasi Abl promuove l'invasione cellulare indicando che la loro attivazione non è una conseguenza della progressione del cancro alla mammella, ma che queste chinasi sono coinvolte nella conversione del tumore allo stadio invasivo (Srinivasan et al., 2006). Inoltre è stato dimostrato che il meccanismo che causa l'attivazione di Arg nel cancro invasivo alla mammella non comporta traslocazioni cromosomiali.

MATERIALI E METODI

1. Linee cellulari

Le linee cellulari renali umane Hek 293T e Caki-1 sono state ottenute dalla banca ATCC (American Type Culture Collection). La linea Hek 293T è una linea embrionale renale trasformata con adenovirus, mentre la linea Caki-1 deriva da un paziente con carcinoma renale clear cell.

Le cellule di entrambe le linee crescono adese e vengono normalmente mantenute in coltura ad una temperatura di 37°C e in presenza di 5% CO₂ in terreno D-MEM LG (Dulbecco's modified medium low glucose) addizionato di 10% FBS (v/v), 1% penicillina/streptomicina (v/v), 1% fungizone (v/v), 0,5% glutammina (v/v).

La linea SH-SY5Y è stata invece acquistata dalla Banca Cellulare di Genova. Rappresenta un subclone adrenergico della linea cellulare SK-N-SH, originariamente ottenuta da un paziente con neuroblastoma. La linea parentale SK-N-SH non presenta l'amplificazione del gene N-myc, caratteristica della maggior parte delle linee cellulari di neuroblastoma, ed è costituita da due fenotipi cellulari distinti dal punto di vista sia morfologico che biochimico: il fenotipo neurologico (N-type) e il fenotipo epitelioido (S-type). Entrambi i fenotipi possono andare incontro a transdifferenziazione reciproca; questo fenomeno può essere dovuto alla natura multipotente delle cellule della cresta neurale da cui origina il neuroblastoma. Nonostante la linea SH-SY5Y derivi da un subclone di tipo neuroblastico mantiene una percentuale di cellule di tipo S (Encinas et al., 2000).

Queste cellule crescono adese e vengono normalmente mantenute in coltura in terreno D-MEM HG (Dulbecco's modified medium high glucose) addizionato di 10% FBS (v/v), 1% penicillina/streptomicina (v/v), 1% fungizone (v/v), 2% glutammina (v/v) ad una temperatura di 37°C e in presenza di 5% CO₂.

Le colture primarie di fibroblasti allestite da biopsie cutanee di pazienti affetti da malattia di Alzheimer e da volontari sani sono state fornite dal prof. Carlo Ferrarese (Dipartimento di Neuroscienze, Università Milano Bicocca).

2. Trattamenti cellulari

La linea cellulare SH-SY5Y è stata trattata con All-Trans-Retinoic-Acid (ATRA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e oligomeri di Abeta(1-42) (Sigma-Aldrich) secondo le seguenti modalità:

- ✓ **Trattamento con ATRA:** L'ATRA è stato risospeso in etanolo assoluto ed aggiunto al terreno di coltura un giorno dopo la piastratura delle cellule, in numero di 2×10^5 in piastre da 8,5 cm di diametro, ad una concentrazione finale di 20 μM . Il trattamento è durato 6 giorni. La concentrazione finale di etanolo non era mai superiore allo 0,1%, concentrazione a cui non si riscontrano effetti sulla crescita o sul differenziamento delle cellule SH-SY5Y (Pahlman, 1984). Come controllo negativo sono state utilizzate le stesse cellule trattate con solo terreno completo, precedentemente descritto per questa linea cellulare.
- ✓ **Trattamento con oligomeri di Abeta (1-42):** 100 μg di peptide Abeta (1-42) liofilizzato sono stati risospesi in 100 μl di 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolo (HFIP, Sigma-Aldrich). Dopo aver aliquotato la soluzione secondo necessità, l'HFIP è stato fatto evaporare e il peptide mantenuto a -20°C . Subito prima di utilizzare la quantità necessaria di peptide la corrispondente aliquota è stata risospesa in 1 μl di DMSO e in almeno 50 μl di terreno di coltura completo. Il tutto viene mantenuto per 24 ore a 4°C (Blaine Stine et al. 2002). I trattamenti sulla linea cellulare SH-SY5Y sono stati eseguiti con oligomeri di Abeta, ad una concentrazione di $0,01\mu\text{M}$ che venivano aggiunti alle cellule un giorno dopo averle piastrate, in numero di 8×10^5 in piastre da 8,5 cm di diametro. Il trattamento è durato 72 ore. Come controllo negativo le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a trattamento con [0,005% v/v] DMSO (Sigma-Aldrich).

Il terreno, sia nei campioni trattati che controllo, è stato rinnovato ogni 2 o 3 giorni.

3. Analisi delle immagini in contrasto di fase

Per valutare l'effetto dei diversi trattamenti sul numero di prolungamenti per cellula e sulla loro lunghezza media sono state analizzate le immagini in contrasto di fase, ottenute osservando le cellule al microscopio invertito (Ck40 Olympus, Japan) con ingrandimento 40X, di 10 campi diversi e casuali di ogni piastra cellulare trattata, ad intervalli di tempo stabiliti. L'esperimento è stato ripetuto in triplicato per ogni trattamento. Le immagini digitali, acquisite con Olympus Digital Camera C-4040ZOOM sono state sottoposte ad analisi morfometrica utilizzando il software "ImageJ". Per tutte le analisi sono stati considerati solo i prolungamenti con una lunghezza maggiore o uguale a 14 μ m (Heraud et al., 2004).

4. Vettori e transfezioni

Il vettore di espressione transiente FlagCMV2 (Sigma-Aldrich) è un plasmide che contiene un'origine di replicazione batterica, una sequenza per la resistenza all'ampicillina e un promotore, CMV, funzionante in sistemi eucariotici. Esso contiene anche una breve e nota sequenza nucleotidica che codifica un oligopeptide di otto amminoacidi (Flag), la quale, una volta clonato il cDNA di interesse all'interno del vettore, risulta covalentemente legata alla proteina ricombinante. I costrutti corrispondenti alle 8 isoforme full-length di Arg, sono stati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio sottoponendo a mutagenesi sito specifica le isoforme BLCTL e ASCTL, già clonate nel vettore di espressione pFlagCMV2.

1 milione di cellule della linea SH-SY5Y sono state centrifugate a 2000 rpm a temperatura ambiente per 3 minuti e il pellet è stato risospeso in 100 μ l di Cell Line Nucleofector solution V (Lonza, Basel, Svizzera) a cui sono stati aggiunti 3 μ g di DNA plasmidico, contenente i diversi costrutti. La soluzione è stata inserita in cuvetta e sottoposta ad elettroporazione con Amaxa Nucleofector (Lonza) mediante il programma A-23 ottimizzato per il tipo cellulare scelto. Al termine dell'elettroporazione sono stati aggiunti in cuvetta 500 μ l del terreno completo, precedentemente descritto per questo tipo cellulare. Il tutto viene trasferito in un pozzetto di una piastra multi-well da 12 pozzetti contenente i vetrini per immunofluorescenza oppure in piastra da 6 cm per l'estrazione delle proteine.

5. Immunofluorescenza

Le cellule, piastrate in un range di 2×10^4 - 6×10^4 cellule per pozzetto di una piastra multiwell da 12 pozzetti, sono state fatte crescere direttamente su vetrino e fissate con paraformaldeide 4% in tampone fosfato 240 mM per 45 minuti a temperatura ambiente, al termine dei quali la paraformaldeide è stata eliminata e i vetrini lavati ripetutamente con PBS 1X. In seguito le cellule sono state incubate con glicina 0.1 M in PBS per 10 minuti, quindi sono stati bloccati i siti aspecifici e permeabilizzate le cellule tramite un'incubazione di 15 minuti con una soluzione contenente:

- ✓ 1% BSA,
- ✓ 0,6% Triton X-100,
- ✓ 40 mM Phosphate Buffer,
- ✓ 0,9 M NaCl.

I vetrini sono stati quindi incubati per 2 ore in camera buia e umida a 4°C con i seguenti anticorpi primari:

- ✓ l'anticorpo policlonale di coniglio anti-subunità pesante dei neurofilamenti (NF-H, Abcam,)
- ✓ l'anticorpo monoclonale di topo anti-Flag (Sigma-Aldrich,).
- ✓ l'anticorpo monoclonale di topo anti-vimentina (clone V9, DAKO, Glostrup, DK)
- ✓ l'anticorpo monoclonale di topo anti-tubulina (Molecular Probes, Invitrogen)

Gli anticorpi secondari utilizzati: Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG antibodies e Alexa Fluor 555 Goat anti-mouse IgG antibodies (Molecular Probes, Invitrogen) sono stati diluiti 1:100 nella stessa soluzione utilizzata per il bloccaggio dei siti aspecifici e durante lavaggi successivi con il tampone viene aggiunto alla soluzione di lavaggio il colorante nucleare DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Sigma-Aldrich) in concentrazione 1 μ M per la visualizzazione dei nuclei. In alcuni casi si è proceduto alla marcatura del citoscheletro di F-actina tramite Alexa Fluor 594 phalloidin (Molecular Probes, Invitrogen) diluita 1:40 in PBS 1X per 15 minuti a

temperatura ambiente. Infine i vetrini sono stati montati su vetrini porta-oggetto utilizzando 100Polyvinyl alcol mounting medium with DABCO, antifading (Fluka, Sigma-Aldrich) e osservati al microscopio ad epifluorescenza (Zeiss Axiovert 200) ad un ingrandimento 40X o 63X. Quest'ultimo è equipaggiato di una camera Cool SNAP HQ ed è collegato, attraverso una videocamera, a un PC corredato del software "Metamorph" per la visualizzazione e l'analisi delle immagini. Alternativamente i vetrini sono stati osservati al microscopio confocale a fluorescenza Nikon ECLIPSE E600 ad un ingrandimento di 40X. Quest'ultimo è equipaggiato di una camera Laser Scanning System Radiance 2100 (Biorad) ed è collegato ad un PC corredato del software Laser Sharp 2000 per la visualizzazione e l'analisi delle immagini.

La lunghezza d'onda di eccitazione per Alexa fluor red è pari a 488 nm, per Alexa fluor green è pari a 555nm e infine per il DAPI è di 340 nm. Come controllo negativo della marcatura in immunofluorescenza, alcuni vetrini sono stati sottoposti agli stessi trattamenti descritti con l'esclusione dell'incubazione con l'anticorpo primario.

6. Estrazione di RNA mediante TRIZOL®

Le cellule sono state lisate, direttamente su piastra, con 1 ml di TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per 5 minuti a temperatura ambiente; in seguito sono stati aggiunti, come da protocollo, 0,2 volumi di cloroformio e dopo breve agitazione su vortex i campioni sono stati centrifugati a 13.000g per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa è stata trasferita in un nuovo tubo a cui sono stati aggiunti 0,5 volumi di alcool isopropilico e il pellet, ottenuto per centrifugazione a 13.000g per 10 minuti a 4-8°C, è stato lavato con un volume di etanolo al 75%. Il pellet di RNA così ottenuto è stato infine essiccato e risospeso in H₂O precedentemente trattata con DEPC (diethylpyrocarbonate) e dosato mediante lettura spettrofotometrica a 260 e 280 nm. La concentrazione in µg/µl dell'RNA estratto è stata quindi calcolata utilizzando la seguente formula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times D$$

dove D rappresenta il fattore di diluizione dell'RNA campione nel volume finale di lettura. Inoltre è stato valutato il rapporto A_{260}/A_{280} che è risultato essere compreso tra

1,7 e 2. La qualità e l'integrità dell'RNA è stata costantemente controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% in 1x TAE (40 µM TRIS acetato pH 8 e 1 µM EDTA).

7. Sintesi di cDNA

Un'aliquota di 4 µg dell'RNA estratto è stata retrotrascritta a cDNA in un volume finale di 20 µl. Inizialmente l'RNA è stato incubato con 20 pmoli di primers (vedi tabella 2) (random esameri o il primer Arg specifico R, a seconda delle necessità) per 5 minuti a 70°C per favorire la denaturazione dei filamenti di RNA; in seguito questi campioni sono stati raffreddati per 5 minuti a 4°C.

È stata poi aggiunta, ad ogni campione, una miscela di reazione contenente:

- ✓ 4µl di ImProm-II™ Reaction Buffer 5X
- ✓ 1 µl di dNTPs mix (10 mM)
- ✓ 2,4 µl di MgCl₂ (25 mM)
- ✓ 1 µl Improm^{II} Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)
- ✓ H₂O DEPC fino ad un volume di reazione di 15 µl

Dopo un'incubazione a 25°C per 5 minuti, per favorire l'*annealing* dei primers ai filamenti di RNA, la reazione per la sintesi del cDNA è stata condotta a 42°C per 60 minuti; la trascrittasi inversa è stata quindi inattivata a 70°C per 15 minuti.

8. Real-Time Polymerase Chain Reaction

La quantificazione degli amplificati tramite Real-Time PCR si basa sulla possibilità di monitorare la quantità di amplicone che si sta formando attraverso la quantità di fluorescenza che particolari sonde emettono durante la reazione di amplificazione. Il segnale di fluorescenza aumenta in modo direttamente proporzionale all'aumento della quantità del prodotto di PCR. Quindi registrando la quantità di fluorescenza emessa ad ogni ciclo di amplificazione è possibile monitorare la reazione di PCR nella fase esponenziale in cui abbiamo il primo incremento significativo di prodotto di PCR correlabile alla concentrazione iniziale di target. La ricerca del segnale fluorescente si

può attuare con metodiche diverse e tra le diverse chimiche in commercio si è deciso di utilizzare la chimica delle sonde Taqman (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Queste sonde lineari del tutto complementari alle sequenze target sono basate sul principio della FRET, che consiste nel trasferimento di energia da un donatore ad un accettore tramite risonanza. Questo può avvenire quando si ha sovrapposizione tra lo spettro di emissione dei due fluorocromi, purché si trovino sufficientemente vicini tra loro. L'efficienza del trasferimento può essere misurata in due modi: come aumento di fluorescenza del donatore (e in questo caso l'accettore prende il nome di quencher), oppure come aumento di fluorescenza dell'accettore. Nel nostro caso la sonda, che porta alle due estremità della sequenza nucleotidica un reporter e un quencher, non emette fluorescenza finché è intatta. Dopo il legame con la sequenza complementare, viene idrolizzata durante la reazione di amplificazione dall'attività 5'-3' esonucleasica della DNA polimerasi; in questo modo si ha la separazione del reporter dal quencher, che permette così l'emissione di fluorescenza (figura 5).

I fluorocromi più utilizzati per i reporter all'estremità 5' sono FAM (6-carboxy-fluorescein), TET (6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachlorofluorescein), JOE (6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein), VIC™; mentre per i quencher si utilizza di solito la marcatura all'estremità 3' con TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) o con Dark Quencher (MGB). Le variazioni di fluorescenza non correlate alla reazione di PCR vengono normalizzate mediante un fluoroforo interno, il ROX (6-carbossi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina).

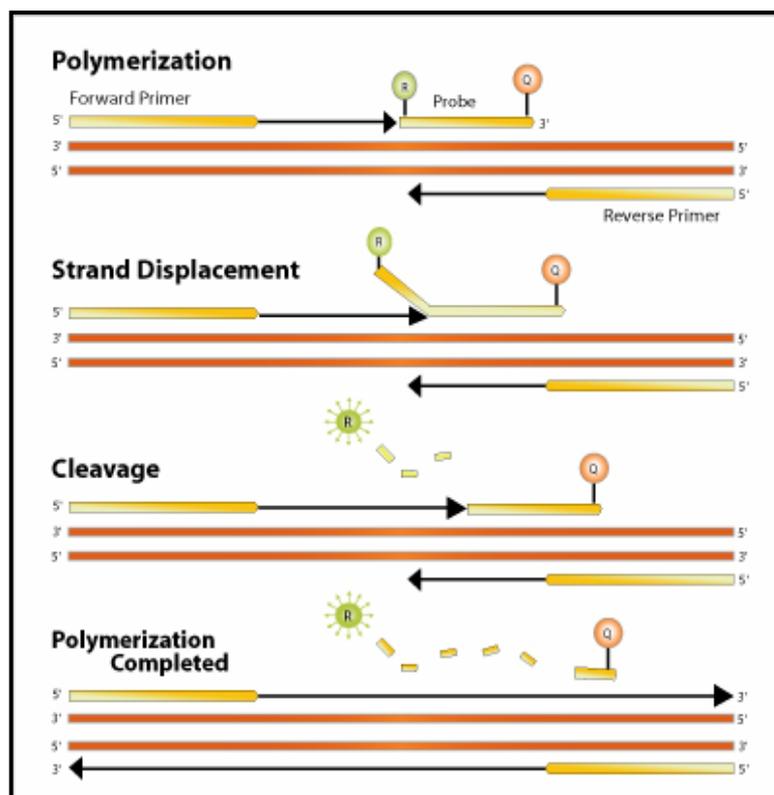


Figura 5: Rappresentazione schematica del funzionamento delle sonde TaqMan

8.1 Caratteristiche delle sonde e dei primers utilizzati

La sonda e i primers utilizzati devono rispondere a determinate caratteristiche. La sonda deve avere un contenuto di G+C dal 40 al 60%, non può terminare con una G, non può avere zone complementari alla regione di appaiamento dei primers e può avere lunghezza variabile da 9 a 40 bp. Inoltre è opportuno che la sua temperatura di *melting* sia di almeno 5°C più alta rispetto a quella dei primers, così da garantirne l'*annealing* prima che inizi la polimerizzazione.

Anche i primers hanno una lunghezza variabile da 9 a 40 bp ma una concentrazione di G+C compresa tra 30 e 80%. E' preferibile disegnare i primers in modo da amplificare solo il cDNA e non eventuali contaminazioni da DNA genomico: pertanto devono essere situati su una giunzione tra due esoni.

La dimensione massima dell'amplicone non deve superare le 400 bp, anche se la dimensione ideale è compresa tra 50 e 150 bp, dimensione con cui la reazione di PCR è più efficiente.

La concentrazione ottimale della sonda è 50-200 nM, mentre per i primers il range di concentrazione ottimale è più ampio, varia da 100 a 900 nM.

Nella tabella 1 sono riportate le sequenze, la localizzazione esonica e le concentrazioni delle sonde e dei primers utilizzati ed è inoltre indicata la lunghezza degli ampliconi ottenuti in paia di basi.

isoforme	primer sense	exon	nM	primer reverse	exon	nM	probe	exon	nM	amplicon
Arg Tot	(O)5'AGTTT AGCACCAG ggttcacag3'	XI-XII	300	(P)5'CTTCCT ATCCCTGG TGAAGCAT3'	XII	300	(Y)5'CACAGG CCTCTAGTGGATC CCCAGC3'(sense)	XII	200	135
Arg AL	(C)5'TCTGCTC TACCCGACT TAACAGatc3'	IA-II	900	(B)5'aaagcttCT GGACTACTG CCTCC3'	II-III	900	(K)5'AGCTGTGT GGAGGATGGATT TGAGGGA3'(sense)	II	150	92
Arg AS	(F)5'TGCTCT ACCCGACTT AACAGaagc3'	IA-III	300	(E)5'ACCTG ATAGCCTCA TTAGTGCCT3'	III	300	(J)5'ATCGTCCC TATGGTTGTGATG TTGAACCC3'(sense)	III	150	83
Arg BL	(A)5'AATATCT TCACCCAGC ATGatcac3'	IB-II	300	(B)5'aaagcttC TGGACTACT GCCTCC3'	II-III	900	(K)5'AGCTGTGT GGAGGATGGAT TTGAGGGA3'(sense)	II	150	89
Arg BS	(D)5'CAATAT CTTCACCCA GCATGaag3'	IB-III	300	(E)5'ACCTGA TAGCCTCAT TTAGTGCCT3'	III	900	(J)5'ATCGTCCCTAT GGTTGTGATGTT GAACCC3'(sense)	III	150	82
Arg CTL	(S)5'CCTTCC GAGAAATG GAGAATCA3'	XII	300	(T)5'GCATGCT GTAGAGAA GCAACAGA3'	XII	300	(Z)5'CCCCATAAGAA ATACGAACTCACGG GTAACCTTCT3'(sense)	XII	200	82
Arg CTS	(Q)5'TGGAG AATCAGCC CCATAAGA3'	XII	300	(R)5'TCCTG GGAAGGG TCATGC3'	XII	300	(V)5'ATACGA ACTCACGGggc ttccagag3'(sense)	XII	200	78
GAPDH	(L)5'GAAGG TGAAGGT CGGAGTC3'	II	200	(M)GAAGAT GGTGATG GGATTTC3'	IV	200	(X)5'CAAGCT TCCCGTTCTC AGCC3' (reverse)	IV	100	276

Tabella 1: Sonde e primers utilizzati per gli esperimenti di Real-Time PCR.

- Le sonde TaqMan sono marcate all'estremità 5' con il fluorocromo reporter FAM, nel caso delle sonde di Arg, o con il reporter VIC, nel caso del gene housekeeping GAPDH, e all'estremità 3' con il quencher TAMRA.
- Le lettere maiuscole e minuscole rappresentano sequenze localizzate su esoni diversi e, nel caso della sonda (v), le sequenze complementari al gene Arg che si giustappongono dopo la perdita del frammento di 309 bp all'interno dell'esone XII.

8.2 Condizioni di Real-Time PCR e analisi dei dati

1 µl di cDNA (corrispondente a 200 ng) è stato amplificato in 25 µl di miscela di amplificazione contenente 1x Universal PCR master mix (Applied Biosystem) e differenti concentrazioni di primers e sonde come indicato in tabella 1.

Le condizioni di Q-PCR utilizzate, in accordo con le linee guida (Applied Biosystem), sono state le seguenti:

1. una pre-incubazione di 10-min a 95°C necessaria per l'attivazione dell'AmpliTaq Gold DNA polymerase.
2. 40 cicli di 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante la valutazione del ciclo soglia (threshold cycle, CT) che indica il punto della reazione al quale il livello di fluorescenza supera una soglia prestabilita, al di sopra del segnale di background. Il CT è inversamente correlato alla quantità iniziale di cDNA, maggiore è la quantità di amplificato prodotto, minore è il CT.

Come controllo interno è stato utilizzato il gene umano della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (huGAPDH) che, nei nostri esperimenti, risponde al ruolo di buon gene *housekeeping*. Idealmente il miglior gene di controllo interno sarebbe quello che presenta le minori variazioni in termini di CT, ovvero quello espresso in modo costante in tutti i campioni. L'amplificazione è stata condotta utilizzando un ABI PRISM 7900HT Sequence Detector (Applied Biosystems).

La quantificazione tramite Real Time PCR può avvenire in due modi: tramite quantificazione relativa, che descrive il cambiamento di espressione di un gene target relativamente ad un gruppo di controllo, oppure tramite quantificazione assoluta, che determina il numero di copie di partenza di un determinato trascritto d'interesse, solitamente correlando il segnale ottenuto dalla PCR con una curva di lavoro standard.

8.2.1 Quantificazione relativa di un trascritto mediante il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$

L'equazione che descrive l'amplificazione esponenziale della PCR è (Livak, 2001):

$$X_n = X_0(1 + E_x)^n \quad [1]$$

dove X_n è il numero il molecole target rilevate al ciclo n della reazione, X_0 è il numero iniziale di molecole target, E_x rappresenta l'efficienza della reazione di amplificazione ed n è il numero dei cicli.

Il threshold cycle (CT) indica il ciclo al quale il target amplificato raggiunge un quantitativo significativo statisticamente. Quindi:

$$X_T = X_0(1 + E_x)^{CT,X} = K_x \quad [2]$$

Dove X_T è il numero di molecole di target al ciclo soglia; CT,X è il CT per l'amplificazione del target e K_x è una costante.

Un'equazione simile per il controllo interno è:

$$R_T = R_0(1 + E_R)^{CT,R} = K_R \quad [3]$$

Dove R_T è il numero di molecole del gene di controllo interno al ciclo soglia; CT,R è il CT per l'amplificazione del controllo interno e K_R è una costante.

Dividendo X_T per R_T si ottiene:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0(1 + E_x)^{CT,X}}{R_0(1 + E_R)^{CT,R}} = \frac{K_x}{K_R} = K \quad [4]$$

Per le reazioni di Real-time con chimica Taqman, i valori esatti di X_T e R_T dipendono da diversi fattori che includono il tipo di marcatura della sonda, la purezza della sonda, il settaggio del *threshold value*, ecc. perciò la costante K difficilmente potrà essere uguale a 1. Quindi assumendo che le efficienze di amplificazione del target e del controllo interno siano uguali otteniamo:

$$E_x = E_R = E \quad [5]$$

$$\frac{X_0}{R_0} (1 + E)^{CT, X-CT, R} = K \quad [6]$$

oppure

$$X_N (1 + E)^{\Delta CT} = K \quad [7]$$

Dove X_N è uguale alla quantità normalizzata di target mentre ΔCT è uguale alla differenza in cicli tra il target e il controllo interno.

Trasformando la [7] si ottiene:

$$X_N = K(1 + E)^{-\Delta CT} \quad [8]$$

Il passaggio finale è quello di dividere X_N di ogni campione (q) per X_N del calibratore (cb).

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K(1 + E)^{-\Delta CT,q}}{K(1 + E)^{-\Delta CT,cb}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta CT} \quad [9]$$

Per ampliconi di piccole dimensioni e per reazioni dove i primers e la concentrazione di Mg^{2+} è stata ottimizzata l'efficienza è molto prossima a 1. Perciò la quantità di target, che nel nostro caso è il trascritto totale di Arg presenti nelle linee cellulari Hek 293T , Caki-1 e SH-SY5Y e nelle colture di fibroblasti, è data da:

$$\text{Quantità di target} = 2^{-\Delta \Delta CT} \quad [10]$$

La quantità di trascritto totale di Arg, nei diversi campioni, è normalizzata per il GAPDH ed è relativa ad un calibratore, considerato uguale a 1, che nel nostro caso è rappresentato o dalla quantità di trascritto presente nella linea cellulare SH-SY5Y controllo o nelle colture primarie di fibroblasti ottenute da biopsie cutanee di volontari sani.

Ogni campione è stato analizzato in duplicato.

8.2.2 Quantificazione relativa di un trascritto mediante il metodo del $2^{-\Delta'CT}$

I livelli relativi dei trascritti delle varie isoforme di ARG rispetto al totale, sono stati calcolati utilizzando il metodo del $2^{-\Delta'CT}$ (Livak 2001).

Infatti, poiché, la quantità di cDNA di partenza è la stessa, ed è anche uguale il CT del gene *housekeeping*, l'equazione [2] non viene divisa per la [3] ma diventa:

$$X_0(1 + E_X)^{CT,X} = K_X \quad [11]$$

Che dopo una semplice trasformazione risulta diventare :

$$X_0 = K_X(1 + E_X)^{-CT,X} \quad [12]$$

Dividendo X_0 di ogni isoforma (q) per X_0 del calibratore (arg totale) si ottiene:

$$\frac{X_{0,q}}{X_{0,cb}} = \frac{K_X(1 + E_X)^{-CT,q}}{K_X(1 + E_X)^{-CT,cb}} = (1 + E_X)^{-\Delta'CT} \quad [13]$$

Dove $\Delta'CT$ è uguale a $CT,q - CT,cb$. Il segno (') è stato utilizzato per distinguere questa espressione dal precedente calcolo del ΔCT che rappresentava la sottrazione del valore del CT del Target dal CT del controllo interno (GAPDH).

Quindi se correttamente ottimizzata la reazione ha un'efficienza uguale a 1 e quindi si può scrivere che:

$$\text{Quantità di ogni singola isoforma relativa al totale} = 2^{-\Delta'CT} \quad [14]$$

A questo punto per una più semplice interpretazione dei dati si è voluto esprimere ogni singola isoforma come percentuale rispetto al totale utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Quantità di ogni singola isoforma relativa al totale in percentuale} = 2^{-\Delta'CT} * 100 \quad [15].$$

9. LONG e Nested Polymerase Chain Reaction

La localizzazione e le sequenze dei primers utilizzati nelle reazioni di Long PCR e di Nested PCR sono schematizzati nella figura 6 e nella tabella 2.

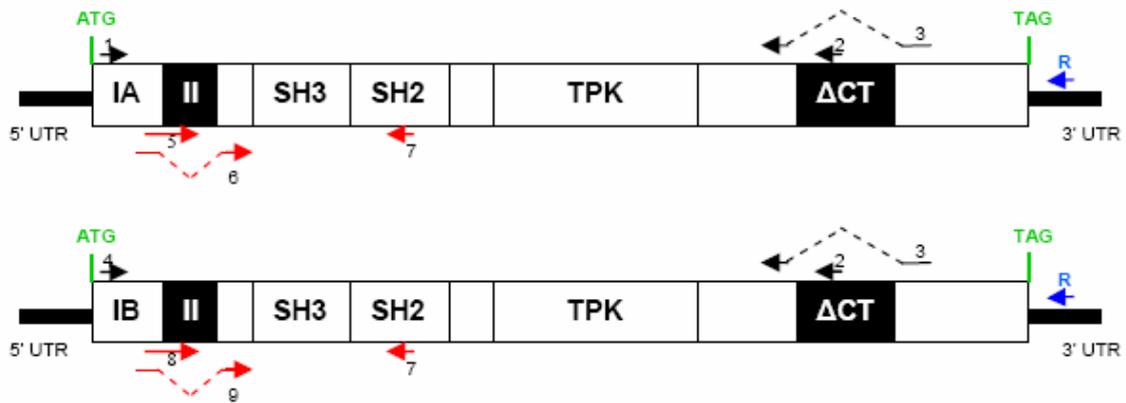


Figura 6: Rappresentazione schematica delle isoforme proteiche di Arg. La localizzazione dei primers usati per la prima e la seconda amplificazione sono rispettivamente indicati in nero e in rosso. In nero sono indicate le regioni suscettibili di splicing

1 μ l di cDNA corrispondente a 200 ng, ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA con il primer specifico per Arg (R), è stato amplificato in presenza di 0,4 μ M di primers, 0,5mM dNTPs, 2% DMSO, 2,5 U di AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich) e buffer 1X, secondo le indicazioni del produttore.

PRIMER	SEQUENZA	LOCALIZZAZIONE
R	AACAAGTCCTTTTCCCTCTCCC	exon XII
1	ATGAATTCGGCAGAGATCAGGACACT	exon IA
2	ACCAGATTCGCCTCTTGCTG	exon XII
3	CTGCTCCTGGAAGCCcctgtg	exon XII
4	AAGCTCCGGGGCTCCAGC	exon IB
5	TCTGCTCTACCCGACTTAACA	exon 1A - II
6	TGCTCTACCCGACTTAACAGaagc	exon 1A - III
7	ATGAATTCACACAGGTCCATGGTACC	exon IV
8	AATATCTTCACCCAGCAT	exon 1B - III
9	CAATATCTTCACCCAGCATGaag	exon 1B - III

Tabella 2: Sequenza dei primers utilizzati nelle due reazioni di PCR e loro localizzazione. Le lettere maiuscole e minuscole dei primers 3, 6 e 9 evidenziano sequenze che si localizzano rispettivamente prima e dopo la regione Δ CT e l'esone 2.

Il programma di amplificazione utilizzato prevedeva una denaturazione iniziale a 98°C per 30 secondi, una denaturazione a 94°C per 15 secondi, un'*annealing* a 60°C per 20 secondi, un'estensione a 68°C per 4 minuti, per un totale di 40 cicli di amplificazione, seguiti da una estensione finale di 10 minuti a 68°C.

5 μ l della prima reazione di amplificazione sono stati poi caricati su di un gel di agarosio all'1% (le dimensioni attese degli ampliconi sono indicate in tabella 3 della sessione "Risultati").

Successivamente è stata allestita una seconda reazione di amplificazione (Nested PCR) per individuare nei campioni già amplificati la presenza o meno dell'esone 2. Questo è possibile in quanto le dimensioni di questi nuovi ampliconi sono notevolmente inferiori rispetto ai precedenti e, separati su di un gel di agarosio 1,8%, è possibile discriminare in essi la presenza o l'assenza delle 63bp corrispondenti all'esone 2.

50 ng dei primi ampliconi sono stati quindi ri-amplificati in presenza di:

- ✓ 0,4 μ M primers,
- ✓ 0,2mM dNTPs,
- ✓ 2mM MgCl₂,
- ✓ 2,5 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystem)
- ✓ buffer 1X.

Il programma utilizzato per la Nested PCR prevede una denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, una denaturazione a 94°C per 30 secondi, un'*annealing* a 60°C per 30 secondi, un'estensione a 72°C per 10 secondi, per un totale di 20 cicli, seguiti da un ulteriore ciclo di estensione finale a 72°C per 10 minuti.

Nella tabella 3 della sessione "Risultati" sono indicate anche le dimensioni degli ampliconi attesi

10. Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide e western blot

10.1 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide al 7.5% è stata condotta secondo il metodo di Laemmli. Sono stati preparati quindi:

- 1 "*Running gel*": acrilamide e N'N' metilenbisacrilamide (T=7.5%, C=2.66%) in 1,5M Tris HCl pH 8.8 e 0,1% SDS, fatto polimerizzare in presenza di 0.05% Ammoniopersolfato (APS) e 0.1% TEMED.
- 2 "*Stacking gel*": (T=4%, C=2.66%), in 1.5 M Tris HCl pH 6.8 e 0.1% SDS, fatto polimerizzare sopra il Running Gel.

I lisati proteici sono stati ottenuti per trattamento delle cellule con un buffer di lisi composto da:

- ✓ 50mM Tris HCl,
- ✓ 1% NP-40,
- ✓ 0,25% DOC,
- ✓ 150 mM NaCl,
- ✓ 1mM EDTA pH 7,4

in presenza di inibitori delle proteasi (protease inhibitor cocktail tablets "Complete", Roche Diagnostics, Germany) e di inibitori delle fosfatasi (phosphatase inhibitor

cocktail 1 e 2, Sigma-Aldrich) sono stati poi dosati mediante Bio-Rad protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

40 µg di ogni lisato cellulare sono stati sciolti in “Sample Buffer” 1X costituito da:

- ✓ 50 mM Tris-HCl pH 6.8,
- ✓ 10 % Glicerolo,
- ✓ 2 % SDS,
- ✓ 1 % 2-Mercaptoetanololo,
- ✓ 1 % Blu di Bromofenolo

e scaldati a 95°C per 4 minuti. I campioni sono stati infine caricati su gel in parallelo con un marcatore di pesi molecolari o “Page Ruler Prestained Protein Ladder” (Fermentas International INC, Canada) o “Prestained Protein SHARPMASS V (11-250KDa)” (Euroclone) a seconda dell’esigenza. L’elettroforesi è stata eseguita in presenza di un buffer contenente: 25 mM Tris, 0.2 M Glicina, 0.1 % SDS utilizzando l’apparato elettroforetico Mini Protean II (Bio-Rad).

Per la corsa è stato applicato un voltaggio costante di 80 V nello “Stacking gel”, e di 100 V nel “Running gel”.

Terminata l’elettroforesi, il gel è stato sottoposto a Western Blotting.

10.2 Western blot

Il gel è stato incubato per 5 minuti in buffer di trasferimento composto da:

- ✓ 10mM acido-3-cicloesammino-1-propansolfonico (CAPS),
- ✓ 10% metanolo

insieme alla membrana di nitrocellulosa che viene così attivata. Entrambi sono stati quindi assemblati a “sandwich” in presenza di carta assorbente e il trasferimento delle proteine è stato condotto per 2 ore a 200 mA, a 4°C. Per verificare il corretto trasferimento delle proteine il filtro viene colorato con Ponceau. Per bloccare i siti aspecifici le membrane sono state incubate, a seconda dell’esigenza, o *overnight* a 4°C in una soluzione contenente 5% di latte in polvere oppure 1 ora a temperatura ambiente

in una soluzione contenente il 5% di albumin bovine serum (BSA, Sigma-Aldrich). È seguita quindi l'incubazione di 2 ore con l'anticorpo primario:

- ✓ policlonale di coniglio diretto verso i domini SH₂ e SH₃ di Arg (diluizione 1:250 in latte 5%) (Millipore, Billerica MA USA)
- ✓ policlonale di coniglio diretto contro β -actina (diluizione 1:1000 in latte 5%) (Sigma-Aldrich).
- ✓ policlonale di coniglio diretto contro p190RhoGAP fosforilato in Y1105 (diluizione 1:100 in BSA 2%) (Abcam, Cambridge, UK)
- ✓ monoclonale di topo diretto contro Flag (diluizione 1:1000 in latte 5%) (Sigma-Aldrich).

Dopo ripetuti lavaggi con TBS TWEEN le membrane vengono incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario anti-immunoglobulina, di coniglio o di topo a seconda dell'esigenza, diluito 1:5000. Gli anticorpi secondari sono coniugati con perossidasi che consente la rilevazione della chemiluminescenza utilizzando il Kit SuperSignal West (Pierce, Rockford, IL, USA) ed esponendo la membrana per tempi diversi a lastra autoradiografica.

SCOPO DELLA RICERCA

Dati di letteratura evidenziano il ruolo chiave della tirosina chinasi Arg, appartenente alla sottofamiglia Abelson, nello sviluppo e funzionalità neuronale con particolare riguardo al suo coinvolgimento nei meccanismi della neuritogenesi (Hernandez et al., 2004) in virtù della sua documentata capacità di riarrangiare il citoscheletro (Peacock et al., 2007). Inoltre è stato descritto che il gene ARG dà luogo, per splicing alternativo, a diversi trascritti. Inizialmente ne furono identificati due che differivano solo nelle estremità 5', e che, per analogia con ABL, vennero definiti come 1A e 1B (Kruh et al., 1990). Recentemente nel nostro laboratorio sono state identificate, con metodiche di RT-PCR qualitativa, nuove isoforme di trascritti di Arg che differiscono nell'estremità 5' e 3'. Si è dimostrato infatti che l'escissione alternativa dell'esone 2, giustapposto all'esone 1A o 1B, produce quattro forme diverse all'estremità 5' definite B-Long (BL), B-Short (BS), A-Long (AL) e A-Short (AS). Lo splicing alternativo di questo esone, corrispondente a 21 amminoacidi, non interrompe l'open reading frame della proteina (Perego et al., 2005). A livello dell'estremità 3' sono state identificate due ulteriori isoforme che differiscono di 309 paia di basi e sono state definite come "Short" e "Long" (CTS e CTL) a seconda che abbiano perso o meno questa sequenza; la delezione elimina parte del primo sito legante l'F-actina (Perego et al., 2005). Combinando i diversi splicing dell'estremità 5' e 3' è possibile ipotizzare l'esistenza di otto diverse isoforme full-length di Arg (ASCTS, ALCTS, ASCTL, ALCTL, BSCTS, BLCTS, BSCTL e, BLCTL), dotate di diverse possibilità di interazione con il citoscheletro e differente coinvolgimento in pathways metabolici.

Sulla base di queste premesse il lavoro descritto in questa tesi è volto a dimostrare l'effettiva espressione endogena di tutte le otto isoforme full-length di Arg utilizzando metodiche di Real-Time PCR e di Long PCR.

Inoltre ci siamo posti l'obiettivo di caratterizzare un modello di differenziazione neuronale "*in vitro*" in cui valutare l'eventuale ruolo di Arg e delle sue isoforme nei meccanismi molecolari della neuritogenesi. Per questi motivi la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y è stata indotta al differenziamento per trattamento con ATRA e Abeta, che come documentato in letteratura è dotata a basse concentrazioni di

attività neurotrofica (Susen and Blochl, 2005), valutando mediante un'analisi morfologica e in immunofluorescenza le caratteristiche differenziative indotte dai trattamenti. Mediante Real-Time PCR si sono poi quantificati, nelle cellule SH-SY5Y trattate e controllo, i livelli del trascritto di Arg ed è stato analizzato il pattern di espressione delle sue isoforme, allo scopo di evidenziare eventuali variazioni in corso di differenziamento. Infine sono stati condotti studi funzionali preliminari sul possibile ruolo neurogenico delle 8 isoforme full-length di Arg per transfezione delle stesse in cellule SH-SY5Y. Le cellule transfettate sono state sottoposte ad immunofluorescenza per valutare la localizzazione cellulare delle diverse isoforme, la loro interazione con proteine del citoscheletro e l'effetto della loro over-espressione sulla distribuzione cellulare delle proteine citoscheletriche.

RISULTATI

Dimostrazione dell'esistenza delle 8 isoforme full-length di Arg nella linea cellulare Caki-1

Basandoci su dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio che dimostravano l'esistenza di diverse estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg (Perego et al., 2005) si poteva ipotizzare che la combinazione dei diversi splicing descritti al 5' e al 3' del gene ARG producesse 8 diversi trascritti (ASCTS, ALCTS, ASCTL, ALCTL, BSCTS, BLCTS, BSCTL e BLCTL) (figura 7).

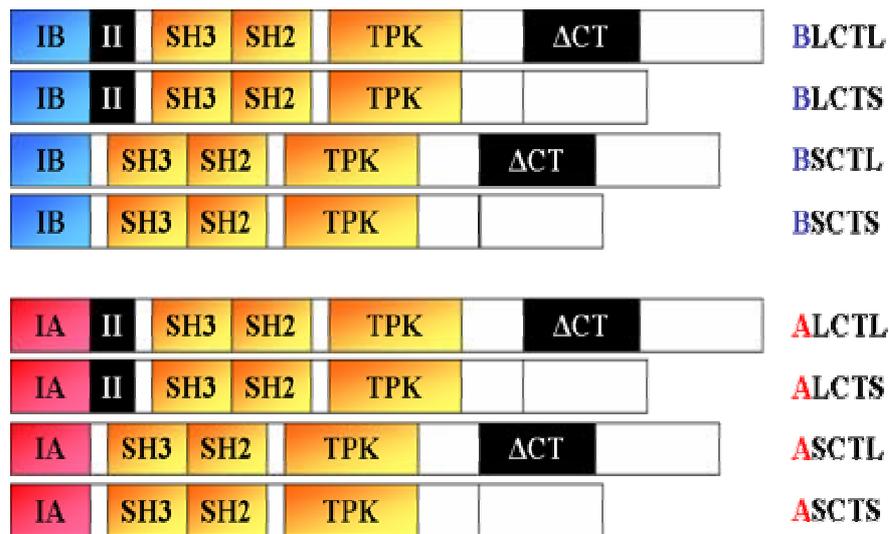


Figura 7: Rappresentazione schematica delle 8 isoforme full-length di Arg, ottenute per combinazione delle diverse estremità 5' e 3'. È indicata la posizione dei domini Src Homology 3 (SH3), Src Homology 2 (SH2), e il dominio tirosino chinasi (TPK). In nero sono indicate le regioni suscettibili di splicing (esone 2 e ΔCT).

Per scegliere quale linea cellulare utilizzare per dimostrare l'effettiva espressione delle 8 isoforme full-length abbiamo analizzato, tramite Real-Time PCR, il livello di espressione delle diverse estremità 5' e 3' nelle linee cellulari renali Hek 293T e Caki-1. L'RNA estratto da queste linee è stato retrotrascritto con random primers e analizzato

mediante probes e primers specifici come indicato in tabella 1 della sessione "materiali e metodi". Da questa analisi è emerso che le 4 isoforme dell'estremità 5' sono tutte espresse solo nella linea cellulare Caki-1, dove prevale l'isoforma BL; al contrario, nelle cellule Hek 293T, sono espresse solo le forme B, con una maggiore espressione del trascritto BS (figura 8). Entrambe le linee cellulari invece esprimono le due isoforme dell'estremità 3' (CTL e CTS), anche se nelle cellule Hek 293T l'isoforma maggiormente espressa è la "Long" (CTL) mentre nelle cellule Caki-1 è la forma "Short" (CTS) (figura 8).

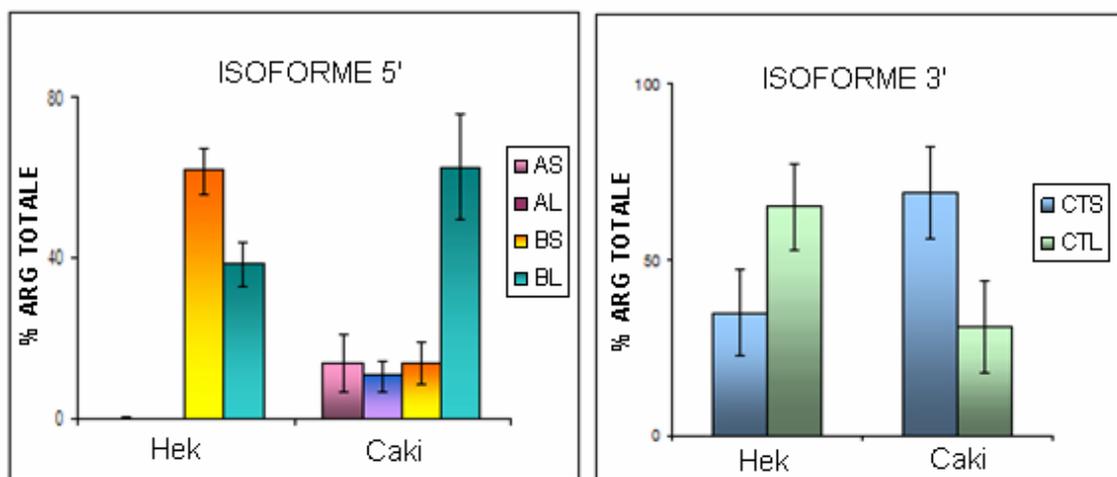


Figura 8: Quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg nelle linee cellulari Hek 293T e Caki-1. Dati medi \pm S.D. di tre esperimenti indipendenti.

Per questo motivo per gli studi di espressione dei trascritti full-length è stata scelta la linea cellulare Caki-1 che, esprimendo tutte le estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg, si poteva ipotizzare esprimesse anche tutte e 8 le isoforme full-length.

L'RNA estratto dalla linea Caki-1 è stato quindi retrotrascritto con un primer specifico per Arg (R nello schema di figura 6 della sessione "materiali e metodi"). Il cDNA ottenuto è stato poi utilizzato per allestire due reazioni di PCR sequenziali come già descritto nella sessione "materiali e metodi" (figura 6 e tabella 2) e riassunto nella tabella 3.

Prima amplificazione (Long)				Seconda amplificazione (Nested)			
campione	primers	ampliconi	isoforma amplificata	campione	primers	ampliconi	estremità 5' amplificata
<i>a</i>	1+2	2053	ALCTL	<i>a1</i>	5+7	400	AL
		1990	ASCTL	<i>a2</i>	6+7	320	AS
<i>b</i>	1+3	2003	ALCTS	<i>b1</i>	5+7	400	AL
		1940	ASCTS	<i>b2</i>	6+7	320	AS
<i>c</i>	4+2	2129	BLCTL	<i>c1</i>	8+7	398	BL
		2066	BSCTL	<i>c2</i>	9+7	339	BS
<i>d</i>	4+3	2064	BLCTS	<i>d1</i>	8+7	398	BL
		1981	BSCTS	<i>d2</i>	9+7	339	BS

Tabella 3: Schema dei primers utilizzati e dei reattivi ampliconi ottenuti nelle reazioni di Long PCR e di Nested PCR per confermare l'espressione dei trascritti corrispondenti alle otto isoforme.

Con la prima PCR, che aveva le caratteristiche di una Long PCR, sono stati ottenuti degli ampliconi con i pesi molecolari attesi per i trascritti delle isoforme di tipo ACTL, ACTS, BCTL e BCTS (figura 9).

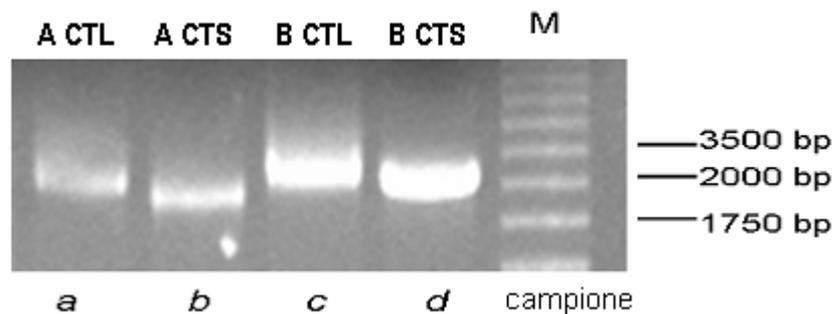


Figura 9: Ampliconi ottenuti mediante Long PCR nella linea cellulare Caki-1. Gel di agarosio 1%.

Questa prima PCR non era però ancora in grado di discriminare le forme “Long” e “Short” dell’estremità 5’ che differiscono solo per le 63 paia di basi corrispondenti all’esone 2. Per questo motivo gli ampliconi ottenuti con le quattro diverse reazioni di Long PCR, sono stati ri-amplificati (Nested PCR). Per la Nested PCR sono stati utilizzati due diversi sets di primers più interni specifici per le singole isoforme “Long” e “Short” 5’-terminali (tabella 3 e vedi anche figura 6 e tabella 2 sessione "materiali e metodi"). Dopo aver verificato accuratamente la specificità dei primers (dati non

riportati) i prodotti di questa seconda amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio all'1,8% (figura 10).

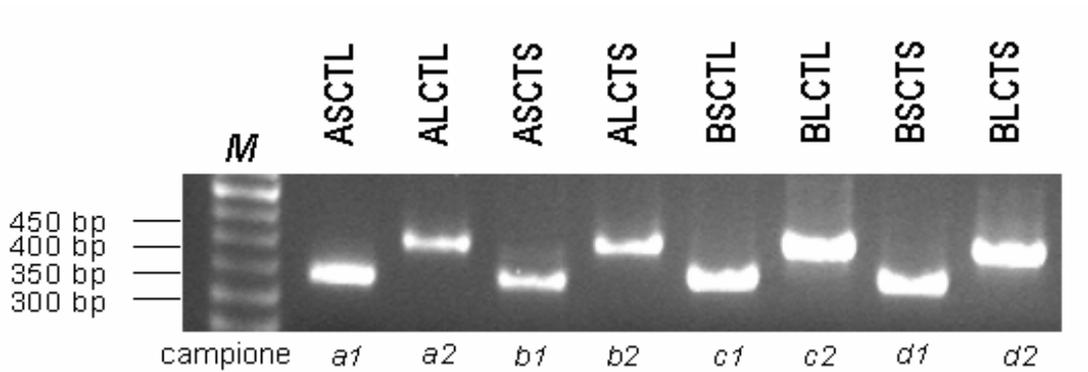


Figura 10: Ampliconi ottenuti mediante Nested PCR nella linea cellulare Caki-1.
Gel di agarosio 1,8%.

La presenza di ampliconi della dimensione attesa dopo Nested PCR dimostra l'espressione costitutiva nella linea cellulare Caki-1 di tutti 8 i predetti trascritti full-length di Arg.

Studio del coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme nel differenziamento neuronale indotto nelle cellule SH-SY5Y mediante trattamento con 20 μ M ATRA

Data l'elevata espressione di Arg nel sistema nervoso centrale ed il suo coinvolgimento nella regolazione della crescita assonale e dendritica ci siamo proposti di studiare l'eventuale coinvolgimento delle diverse isoforme di Arg nella differenziazione neuronale utilizzando un modello di differenziamento *in vitro*. A questo scopo le cellule della linea di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state trattate con 20 μ M ATRA (All-Trans-Retinoic Acid) in terreno completo (DMEM HG + 10% FBS) per 3 e 6 giorni. Quando le cellule della linea SH-SY5Y vengono mantenute in coltura per 3 o 6 giorni senza particolari trattamenti (CTRL) non mostrano evidenti cambiamenti morfologici (figura 11). Al contrario quando le cellule SH-SY5Y vengono trattate con ATRA, a partire dal giorno successivo alla piastratura e continuativamente per 3 o 6 giorni mostrano lo sviluppo di processi neuritici (figura 11).

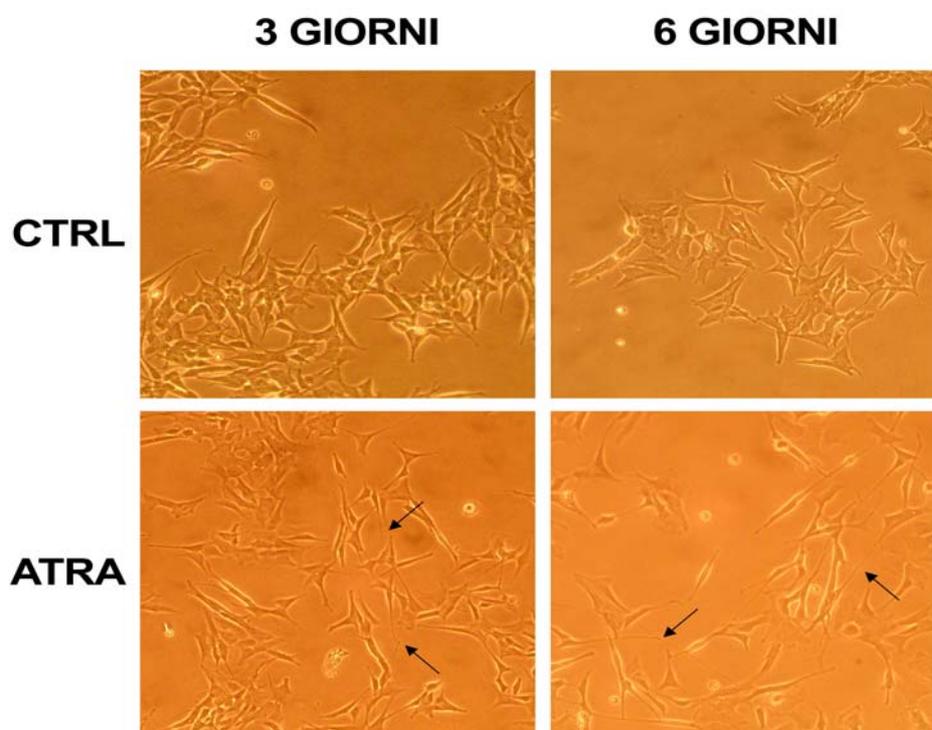


Figura 11: Cellule SH-SY5Y in coltura. Le immagini in contrasto di fase mostrano come nelle cellule trattate con 20 μ M ATRA (ATRA) si sviluppino processi neuritici (freccie nere) assenti nelle cellule controllo (CTRL). Tali prolungamenti sono presenti già dopo 3 giorni di trattamento e diventano ancora più evidenti dopo 6 giorni di trattamento. (40X)

Per meglio caratterizzare i cambiamenti morfologici indotti nelle cellule SH-SY5Y dal trattamento continuativo con ATRA per 6 giorni, le cellule sono state analizzate mediante immunofluorescenza utilizzando actina, tubulina e vimentina come marcatori citoscheletrici e i neurofilamenti ad alto peso molecolare (NF-H) come marcatori del differenziamento neuronale tardivo (figura 12). L'analisi al microscopio a fluorescenza ha evidenziato la presenza di lunghi processi nelle cellule trattate assenti nel controllo. Questi processi inoltre sono risultati positivi anche per l'espressione di NF-H.

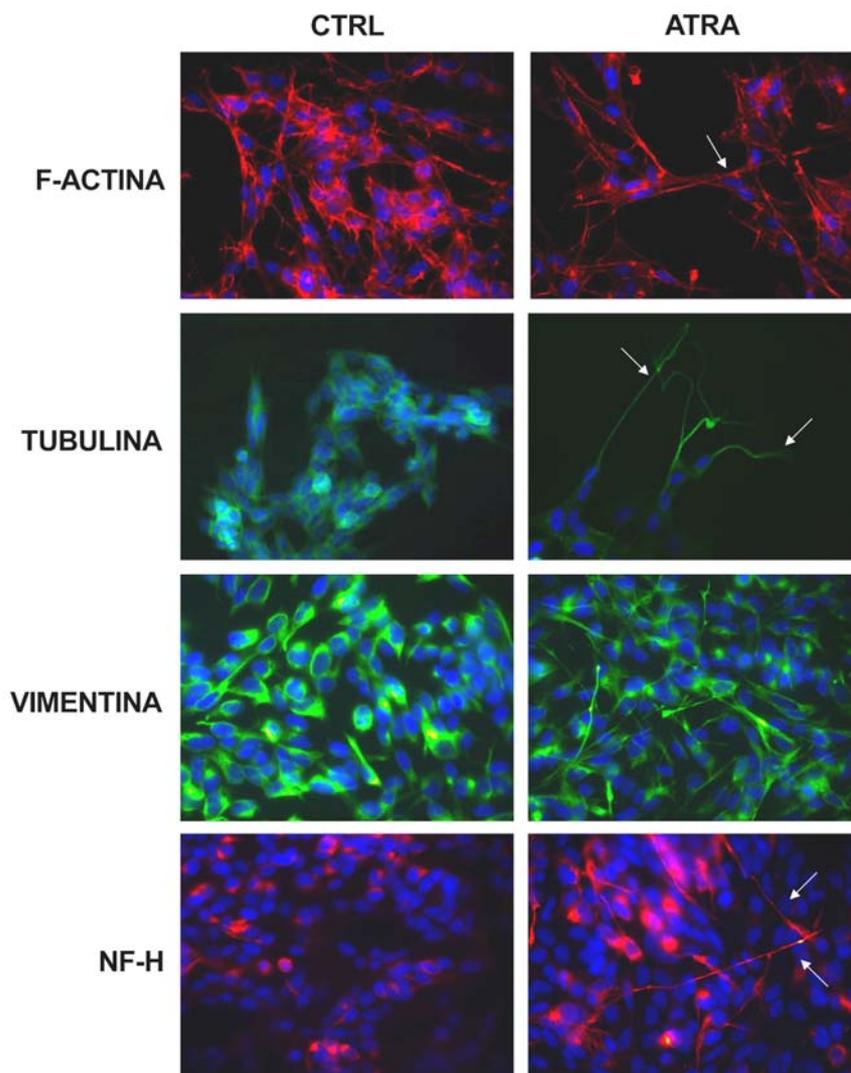


Figura 12: Analisi mediante immunofluorescenza di cellule SH-SY5Y dopo 6 giorni di trattamento. La marcatura delle proteine citoscheletriche: actina, tubulina e vimentina evidenzia la presenza di lunghi prolungamenti cellulari nel campione trattato ma assenti nel controllo (frece bianche). Questi prolungamenti sono positivi inoltre per i neurofilamenti ad alto peso molecolare (NF-H) ad indicare un effettivo differenziamento in senso neuronale. In blu sono stati colorati i nuclei. (40X)

Allo scopo di quantificare gli effetti differenziativi, indotti dal trattamento con ATRA, sulle cellule SH-SY5Y sono state analizzate le immagini in contrasto di fase delle cellule controllo e trattate con ATRA a 3 e a 6 giorni di coltura, valutando la lunghezza e il numero dei processi neuritici.

La misurazione della lunghezza media dei neuriti non ha mostrato variazioni significative ai diversi giorni analizzati nelle cellule controllo, che presentano neuriti con una lunghezza che si mantiene intorno ai 20 μ m (figura 13). Al contrario già dopo 3 giorni di trattamento con ATRA la lunghezza media dei neuriti aumenta, rispetto al controllo, in modo significativo (25,1 \pm 0,5 μ m) fino a raggiungere un massimo di 34,5 \pm 1,7 μ m dopo 6 giorni di trattamento (figura 13).

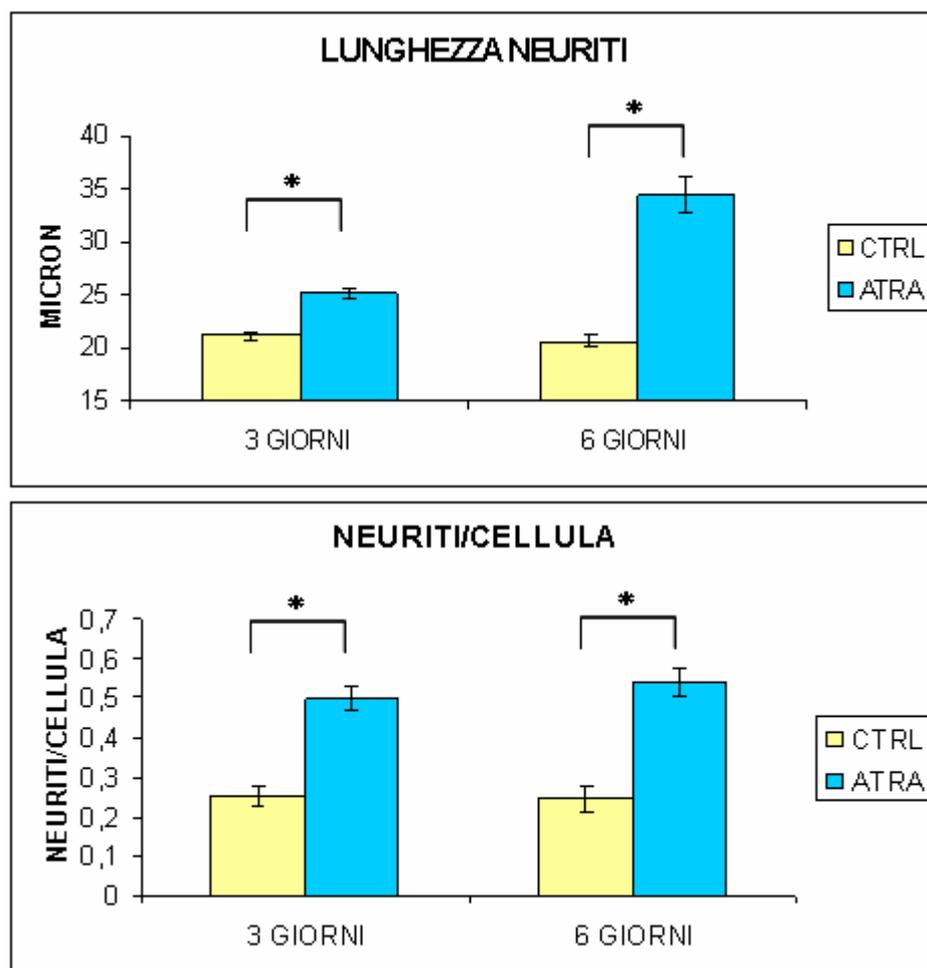


Figura 13: Quantificazione della lunghezza media dei neuriti e del numero dei neuriti per cellula. Dati medi \pm S.E.M. ottenuti dalle immagini in contrasto di fase di 10 campi microscopici diversi e casuali di ogni piastra di cellule controllo (CTRL) o sottoposte a trattamento con 20 μ M ATRA (ATRA) per 3 e 6 giorni. (* p <0,01)

Sulle stesse immagini in contrasto di fase è stato inoltre determinato il rapporto tra il numero di neuriti e il numero di corpi cellulari (figura 13). Anche in questo caso le cellule controllo si mantengono intorno al valore di 0,2 neuriti/cellula. Questo valore incrementa in modo significativo rispetto al controllo già dopo 3 giorni di trattamento con ATRA ($0,5 \pm 0,03$ neuriti/cellula) (figura 13).

Una volta caratterizzato il modello cellulare utilizzato siamo passati alla valutazione del possibile coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme nella neuritogenesi indotta da ATRA. Per questo motivo il cDNA ottenuto per retrotrascrizione con random primers dall'RNA estratto dopo 3 e 6 giorni dalle cellule SH-SY5Y controllo e trattate è stato quantificato, tramite Real-Time PCR, per valutare il livello totale dei trascritti di Arg, utilizzando i primers O e P e la sonda Y come indicato nella tabella 1 della sessione "materiali e metodi".

La quantificazione relativa mediante Real-Time PCR ha mostrato che, nonostante in una fase iniziale del trattamento si abbia una diminuzione dell'espressione di Arg totale nelle cellule trattate rispetto alle cellule controllo, dopo 6 giorni di trattamento con ATRA Arg risulta essere over-espresso rispetto al controllo (figura 14).

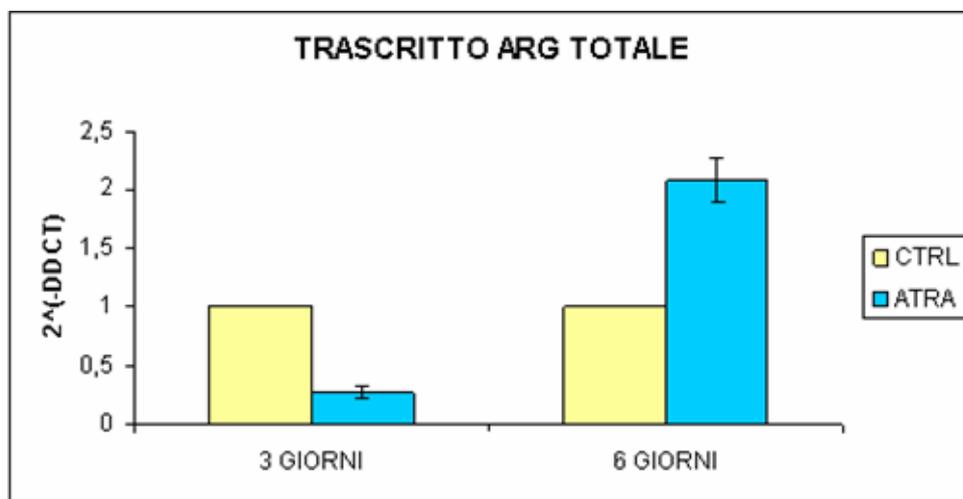


Figura 14: Quantificazione relativa tramite Real-Time PCR del livello totale del trascritto di Arg. I valori espressi come $2^{-\Delta\Delta CT}$ rappresentano il numero di volte in cui l'espressione totale del trascritto di Arg nel campione trattato con ATRA (ATRA) differisce rispetto al controllo (CTRL) scelto, per ogni tempo analizzato, come calibratore e posto uguale a 1. Dati medi \pm S.E.M di tre esperimenti indipendenti.

Successivamente è stato valutato il livello di espressione delle diverse estremità 5' e 3' di Arg. La quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle 4 isoforme 5' di Arg ha evidenziato innanzitutto l'assenza delle isoforme A nelle cellule SH-SY5Y sia controllo che trattate (figura 15). Le uniche isoforme 5' presenti risultano quindi essere le B con una maggiore espressione sia nel trattato che nel controllo dell'isoforma "Short" (BS), che manca dell'esone 2, rispetto alla corrispondente forma "Long" (BL), e questo pattern di espressione si mantiene a tutti i tempi considerati (figura 15). Le isoforme 3' di Arg invece, sono entrambe presenti e, anche in questo caso, si ha una maggiore espressione dell'isoforma "Short" (CTS), la quale manca di una porzione del primo dominio di legame per l'actina, rispetto alla controparte "Long" (CTL). Anche questo pattern di espressione non presenta variazioni dopo trattamento con ATRA ai tempi considerati (figura 15).

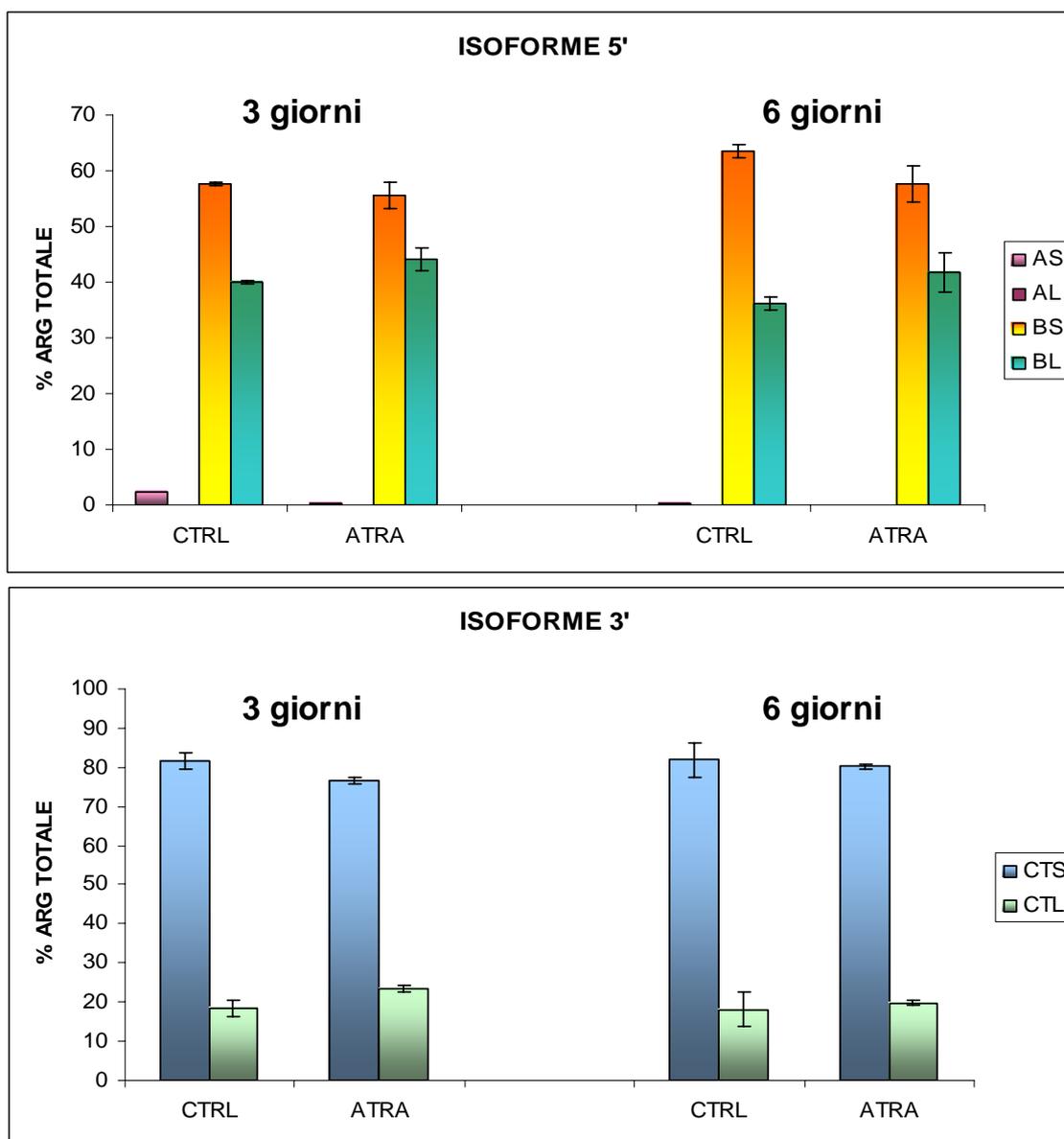


Figura 15: Quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg nella linea cellulare SH-SY5Y trattata e non con ATRA. Il pattern di espressione delle isoforme 5' e 3' di Arg non varia ai tempi considerati, nelle cellule trattate rispetto alle cellule controllo. Dati medi \pm S.D. di tre esperimenti indipendenti.

Nello stesso modello cellulare abbiamo analizzato anche l'espressione proteica di Arg mediante 1D-western blot dei diversi lisati cellulari ibridato con l'anticorpo specifico contro i domini SH₂ e SH₃ comuni a tutte le isoforme proteiche di Arg. Ai diversi tempi analizzati è stato evidenziato, sia nelle cellule controllo che trattate, un pattern a più bande (figura 16A) verosimilmente attribuibili alle isoforme con diverse estremità C-terminale, che differendo per circa 100 amminoacidi sono discriminabili per elettroforesi monodimensionale, a differenza delle isoforme con diverse estremità N-

terminale che, differendo solo per i 21 amminoacidi codificati dall'esone 2, non sono discriminabili con una elettroforesi di questo tipo. I risultati ottenuti con 1D-Western Blot, quantificati mediante analisi densitometrica (figura 19B) sono in accordo con i dati ottenuti tramite Real-Time PCR. Infatti nelle cellule trattate con ATRA si ha, a 3 giorni, un decremento significativo dell'espressione di Arg che successivamente aumenta fino a raggiungere, a 6 giorni di trattamento, un valore simile a quello ottenuto per le cellule controllo. Anche la prevalenza della banda a minore peso molecolare, verosimilmente corrispondente alle isoforme CTS, in tutti i lisati analizzati (figura 16A) è in accordo con i dati di Real-Time PCR sulle isoforme di Arg (figura 15) che evidenziano la costante prevalenza delle isoforme CTS in tutti i campioni controllo e trattati analizzati.

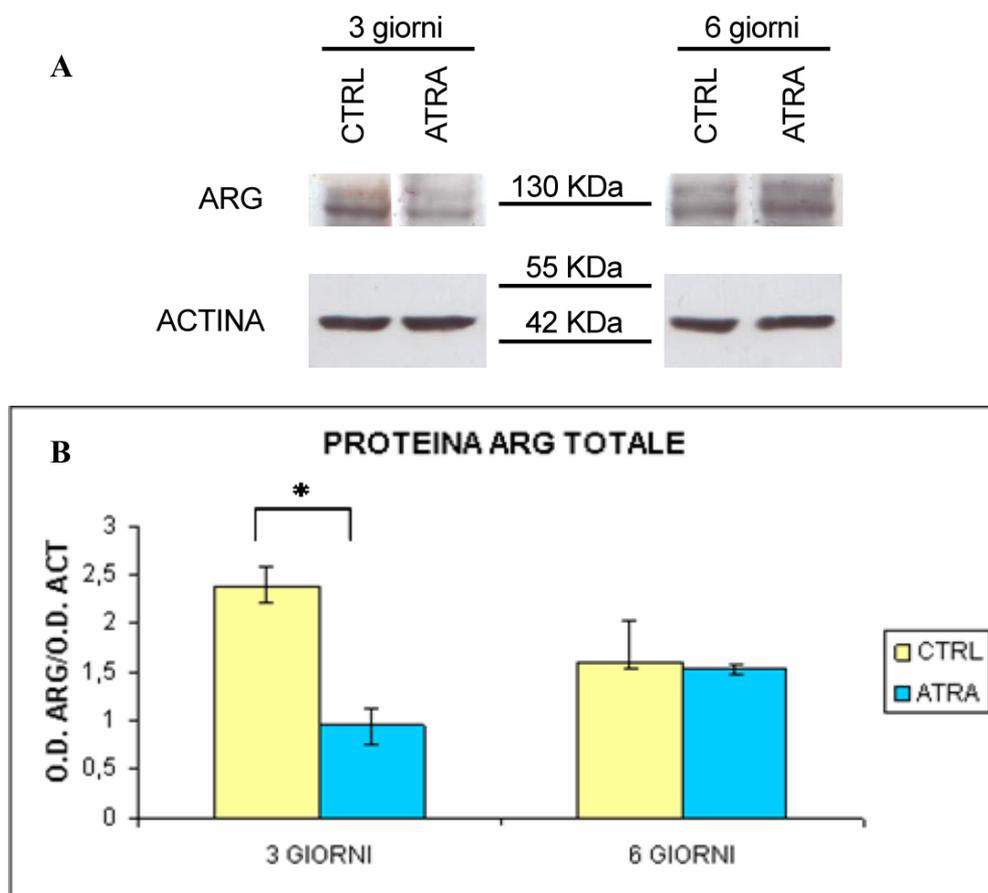


Figura 16: A) Western blot dei lisati delle cellule SH-SY5Y controllo (CTRL) e trattate con ATRA (ATRA) per 3 e 6 giorni. Sono stati caricati 20µg di lisato proteico totale per ogni campione. La parte superiore della membrana è stata ibridata con l'anticorpo anti-Arg, mentre la parte inferiore è stata ibridata con l'anticorpo anti-actina.

B) Analisi densitometrica delle bande proteiche di Arg. I valori sono espressi come densità ottica totale (O.D.) delle bande di Arg normalizzate per l'O.D. della rispettiva banda di actina. Dati medi ± S.E.M di tre esperimenti indipendenti. (*p<0,01)

Dai dati della letteratura è noto che Arg è coinvolto nel pathway delle proteine della famiglia Rho; in particolare Arg è in grado di fosforilare e quindi attivare p190RhoGAP, l'inibitore di Rho in un sito specifico, la tirosina 1105 (Y1105). L'inibizione di Rho è inoltre indispensabile per la neuritogenesi. Pertanto abbiamo analizzato il livello di p190RhoGAP fosforilato in Y1105 nelle cellule trattate per 6 giorni con 20 μ M ATRA. Le proteine estratte dalle cellule SH-SY5Y controllo e trattate con ATRA sono state analizzate mediante elettroforesi monodimensionale seguita da western blot con l'anticorpo diretto contro p190RhoGAP fosforilato nella tirosina 1105 (PY1105p190RhoGAP) (figura 17). Sebbene il livello di espressione proteica di Arg (figura 16B) sia simile nelle cellule controllo e nelle cellule trattate per 6 giorni con ATRA il livello di p190RhoGAP fosforilato risulta essere maggiore nelle cellule trattate.

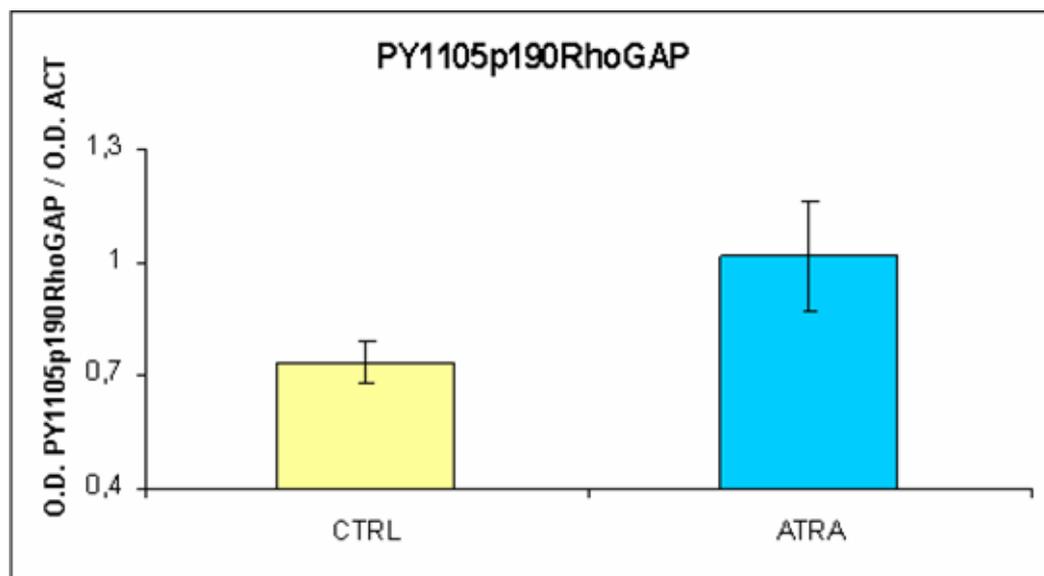


Figura 17: Analisi densitometrica della banda proteica di PY1105p190RhoGAP in cellule SH-SY5Y controllo e dopo 6 giorni di trattamento con 20 μ M ATRA. I valori sono espressi come densità ottica (O.D.) della banda di PY1105p190RhoGAP normalizzata per l'O.D. della rispettiva banda di actina. Dati medi \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti.

Analisi morfologica e molecolare di cellule SH-SY5Y transfettate con le diverse isoforme di Arg

Dato che il livello di espressione delle singole isoforme full-length di Arg non è purtroppo valutabile né tramite Real-Time PCR, per limiti legati alla metodica, né tramite western blot, per la mancanza di un anticorpo specifico, per meglio comprendere il loro ruolo nel differenziamento neuronale abbiamo transfettato in modo transiente le cellule SH-SY5Y con i vettori d'espressione (pFlag-CMV2) contenenti i costrutti codificanti per le 8 isoforme full-length di Arg, ottenendo un'efficienza di transfezione del 10% circa. Abbiamo quindi valutato l'effetto dell'overespressione delle diverse isoforme di Arg sulla morfologia cellulare (figura 18). Come controllo negativo è stato utilizzato lo stesso vettore di espressione contenente LAC Z. Le cellule transfettate con il vettore controllo non presentano variazioni morfologiche rispetto alle cellule non transfettate (dati non riportati). L'isoforma BSCTS non era valutabile sulle cellule transfettate a causa probabilmente della scarsa efficienza del costrutto. La transfezione di tutte le isoforme B mostra una distribuzione di Arg uniforme nel citoplasma e nei prolungamenti cellulari; inoltre la transfezione delle isoforme BLCTL e BSCTL causa una riduzione significativa ($p < 0,01$) della dimensione cellulare e l'acquisizione di una morfologia più rotondeggiante rispetto alle cellule controllo (LAC Z) (figura 18). Al contrario l'isoforma BLCTS è l'unica, tra le forme B, a indurre nelle cellule transfettate la formazione di prolungamenti cellulari (figura 18). La transfezione di tutte le isoforme A e, in particolare ALCTS, normalmente assenti in questo tipo cellulare, causa invece un fenotipo aberrante caratterizzato da cellule ricche di estroflessioni di diversa lunghezza e spesso filopodiformi. La transfezione delle isoforme A mostra una distribuzione di Arg citoplasmatica anche se sono ben visibili addensamenti proteici a livello dei prolungamenti e soprattutto delle giunzioni cellulari; tra queste l'isoforma ALCTS sembra causare inoltre una maggiore produzione di estroflessioni cellulari (figura 18).

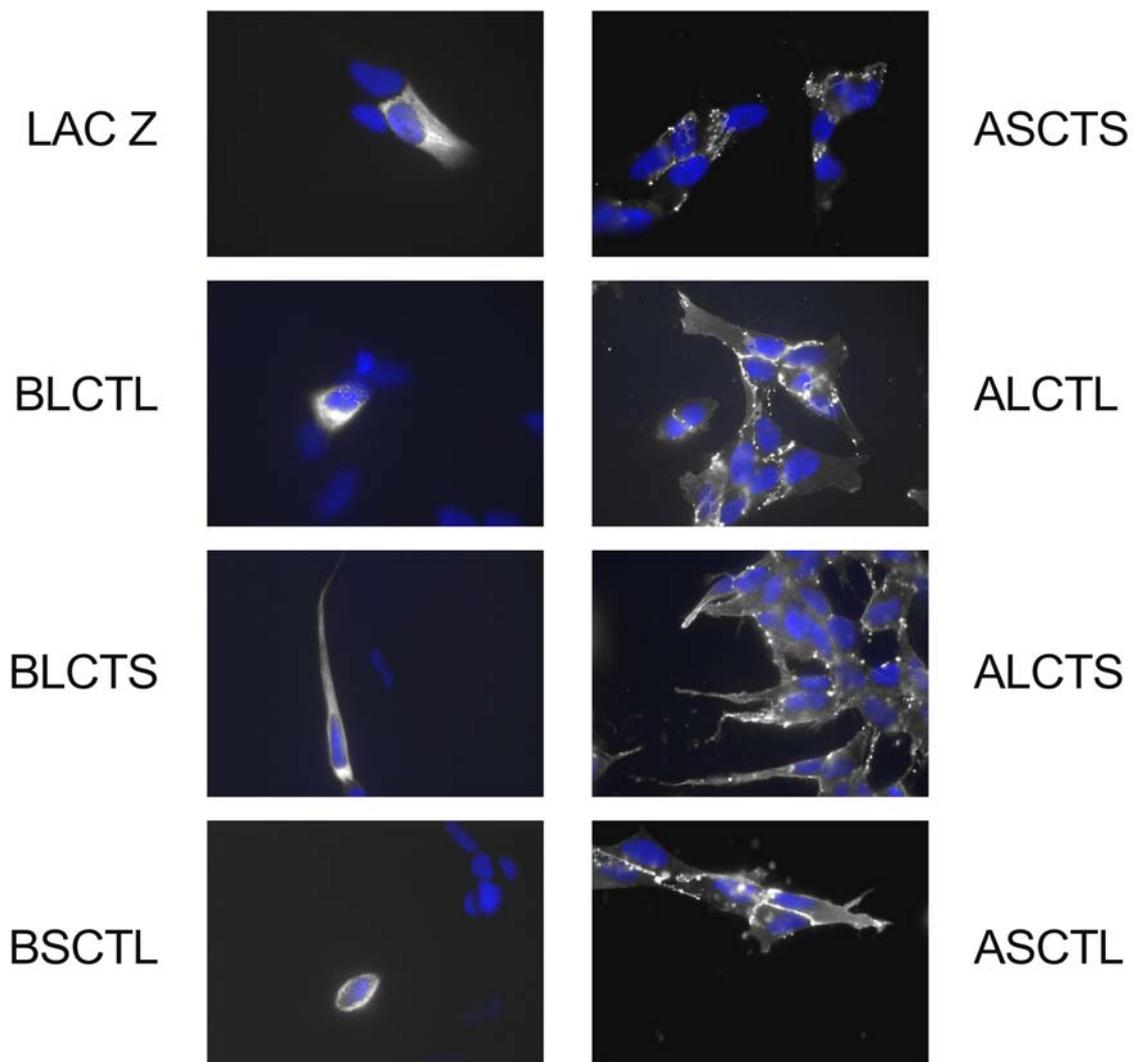


Figura 18: Analisi mediante immunofluorescenza delle cellule SH-SY5Y transfettate con le diverse isoforme full-length di Arg. Le cellule transfettate con LAC Z sono state usate come controllo negativo della transfezione. Il segnale in bianco è dato dall'anticorpo anti-Flag e in blu sono stati colorati i nuclei. (63X)

Quindi le due isoforme che, quando transfettate nelle cellule SH-SY5Y, sembrano indurre maggiormente la formazione di estroflessioni cellulari sono state utilizzate in ulteriori saggi di transfezione, seguiti da analisi in immunofluorescenza per valutare l'effetto della loro overespressione sul citoscheletro di actina e tubulina. Dall'analisi, condotta mediante microscopia confocale, è emerso che nelle cellule SH-SY5Y transfettate con l'isoforma BLCTS la distribuzione dell'F-actina, in posizione corticale e organizzata nel citoplasma a formare le "stress fibers", anche se in quantità minore rispetto alle cellule non transfettate, e della tubulina, uniformemente distribuita nel

citoplasma, non subiscono variazioni se confrontate con le cellule non transfettate (figura 19). Nelle cellule transfettate con l'isoforma ALCTS rimane invariata la distribuzione dell'F-actina ma non quella della tubulina. Quest'ultima, infatti si distribuisce abbondantemente e in modo omogeneo non solo nel citoplasma ma anche nel nucleo (figura 20). Tali alterazioni citoscheletriche non si riscontrano nelle cellule controllo transfettate con il vettore LAC Z (figura 21).

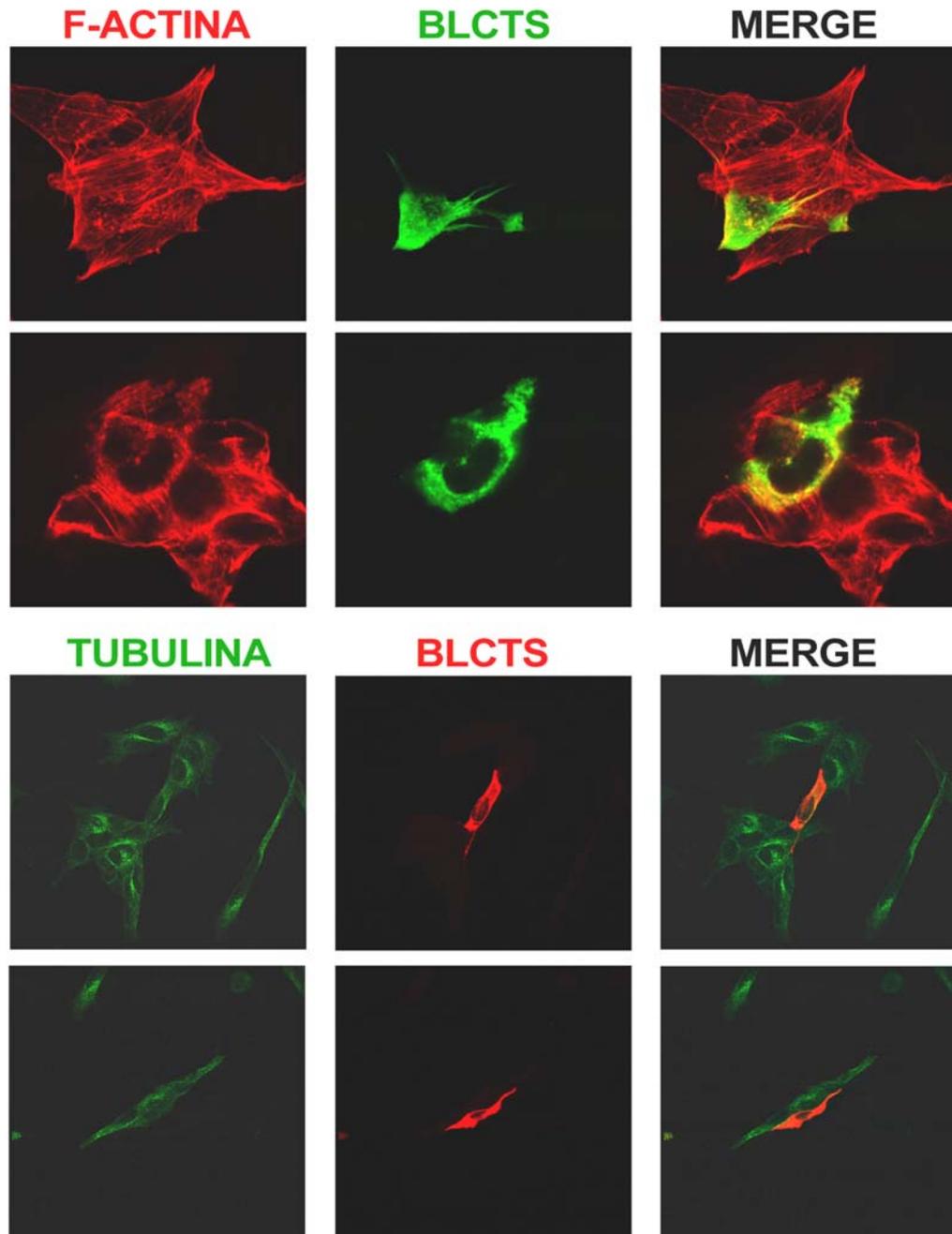


Figura 19: Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate con l'isoforma BLCTS. In alto la distribuzione dell'F-actina (in rosso) e dell'isoforma BLCTS (in verde); in basso la distribuzione della tubulina (in verde) e dell'isoforma BLCTS (in rosso). Sono state riportate anche le immagini con la sovrapposizione dei due segnali (merge). (40X).

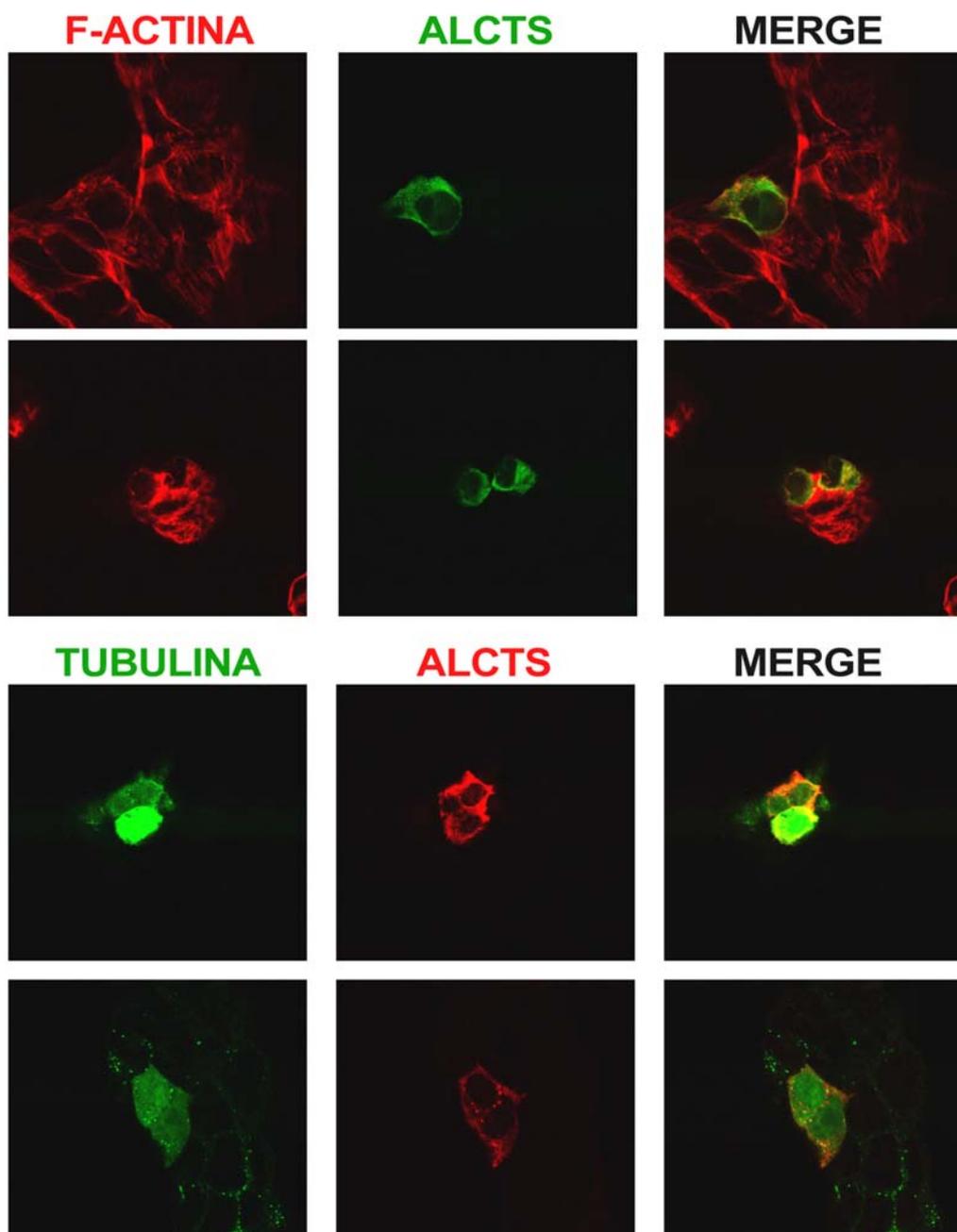


Figura 20: Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate con l'isoforma ALCTS. In alto la distribuzione dell'F-actina (in rosso) e dell'isoforma ALCTS (in verde); in basso la distribuzione della tubulina (in verde) e dell'isoforma ALCTS (in rosso). Sono state riportate anche le immagini con la sovrapposizione dei due segnali (merge). (40X).

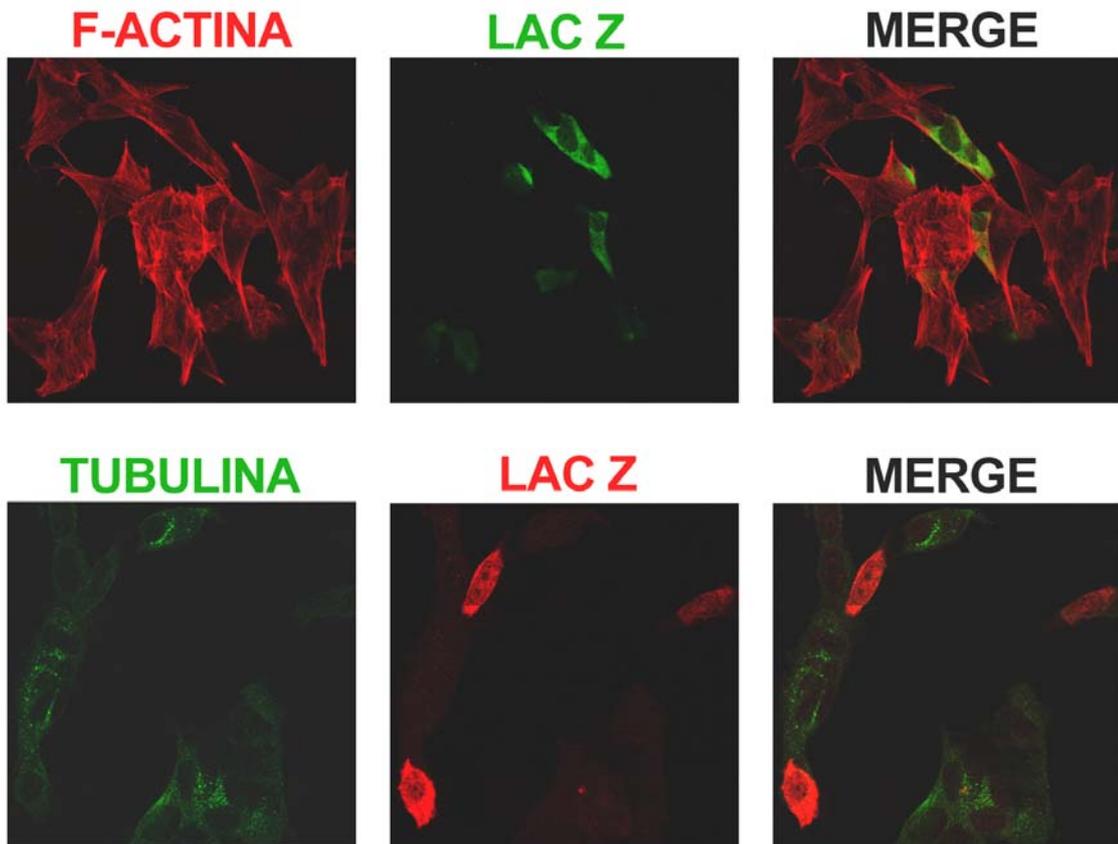


Figura 21: Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate con il controllo negativo LAC Z. In alto la distribuzione dell'F-actina (in rosso) e di LAC Z (in verde); in basso la distribuzione della tubulina (in verde) e di LAC Z (in rosso). Sono state riportate anche le immagini con la sovrapposizione dei due segnali (merge). (40X).

Questo dato è stato confermato dall'analisi delle stesse cellule transfettate, tramite microscopia confocale condotta lungo il piano z (figura 22). Infatti nelle cellule transfettate con l'isoforma BLCTS, che si distribuisce a livello corticale e nel citoplasma, la distribuzione di actina e tubulina in posizione corticale è come nelle cellule non transfettate (figura 22). Nelle cellule transfettate con l'isoforma ALCTS si ha una normale distribuzione corticale di F-actina, ma la tubulina si accumula nel citoplasma, dove colocalizza con Arg, ma diffonde anche all'interno del nucleo (figura 23).

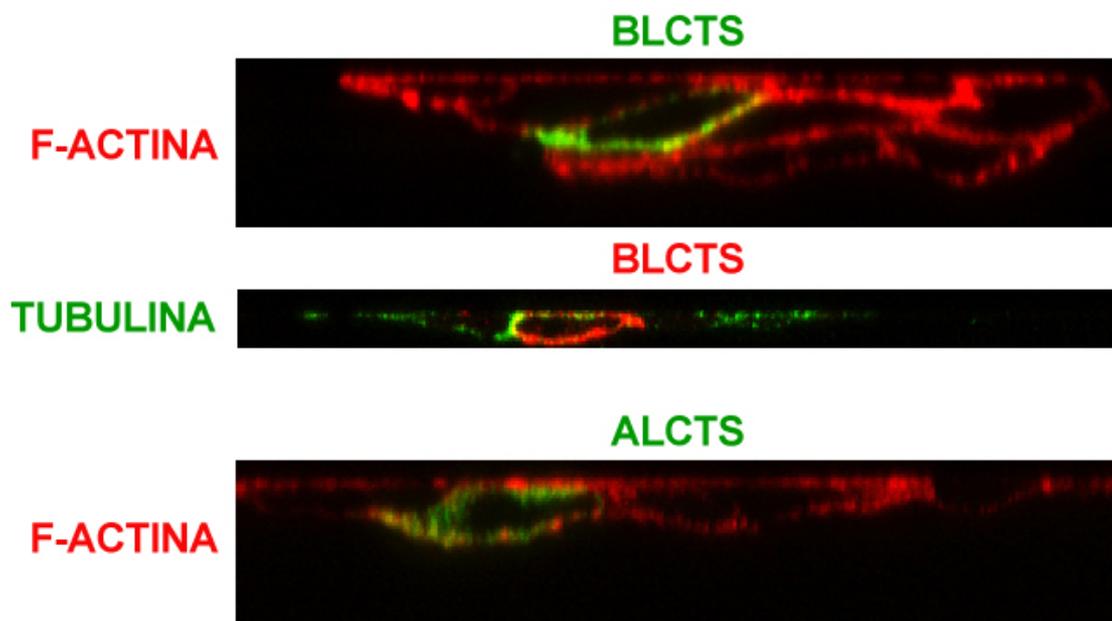


Figura 22: Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate osservate lungo il piano z. Nelle immagini che mostrano la distribuzione dell'F-actina (in rosso) le cellule transfettate sono marcate in verde, al contrario nell'immagine relativa alla distribuzione della tubulina (in verde) le cellule transfettate sono state marcate in rosso.

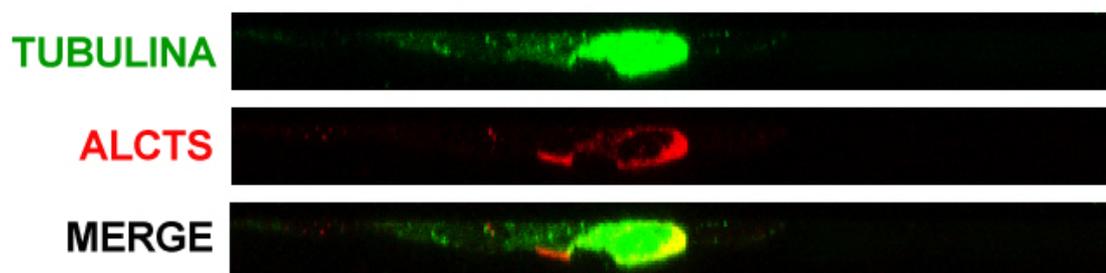


Figura 23: Analisi in microscopia confocale di cellule SH-SY5Y transfettate osservate lungo il piano z. In alto la distribuzione della tubulina (in verde), al centro quella dell'isoforma ALCTS (in rosso), in basso l'immagine con la sovrapposizione dei due segnali (merge).

Inoltre per cercare di comprendere la natura dei prolungamenti cellulari che si osservano nelle cellule SH-SY5Y in seguito alla transfezione con le due isoforme analizzate abbiamo valutato, in immunofluorescenza, l'espressione della proteina dei neurofilamenti (NF-H). I prolungamenti cellulari, prodotti nelle cellule transfettate con BLCTS e con ALCTS non risultano positivi a questo marcatore neuronale (figura 24).

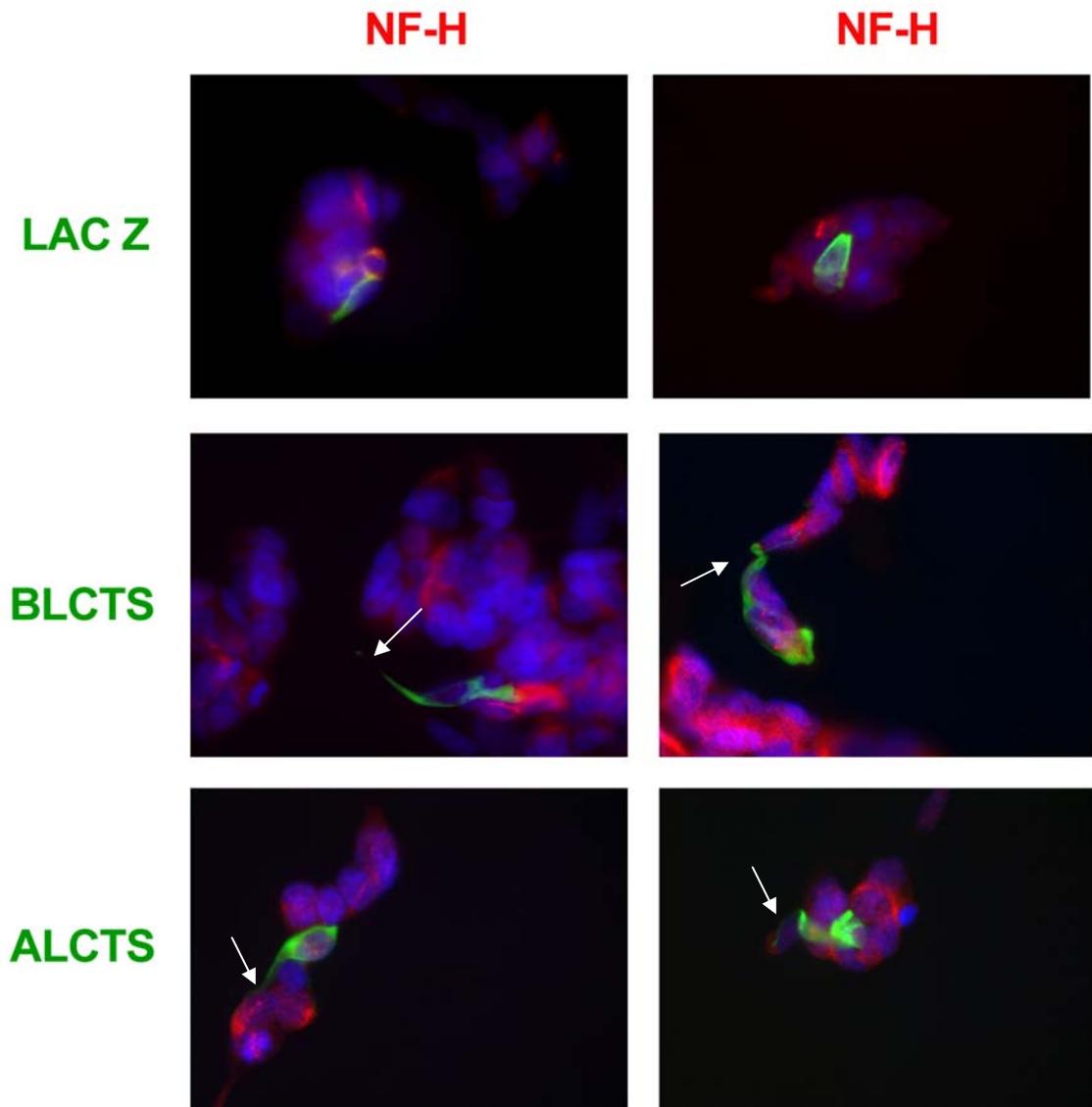


Figura 24: Analisi in immunofluorescenza di cellule SH-SY5Y transfettate. Le cellule transfettate (in verde) presentano prolungamenti cellulari (frece bianche) negativi per NF-H (in rosso). Le cellule transfettate con LAC Z sono state usate come controllo negativo della transfezione. In blu sono stati colorati i nuclei. (63X).

Sui lisati delle cellule SH-SY5Y transfettate con le isoforme BLCTS e ALCTS di Arg è stato valutato, mediante western blot il livello di p190RhoGAP fosforilato in Y1105. Risultati preliminari evidenziano, in entrambe i casi, una correlazione tra la quantità di isoforma di Arg transfettata e il livello di fosforilazione di p190RhoGAP (figura 25).

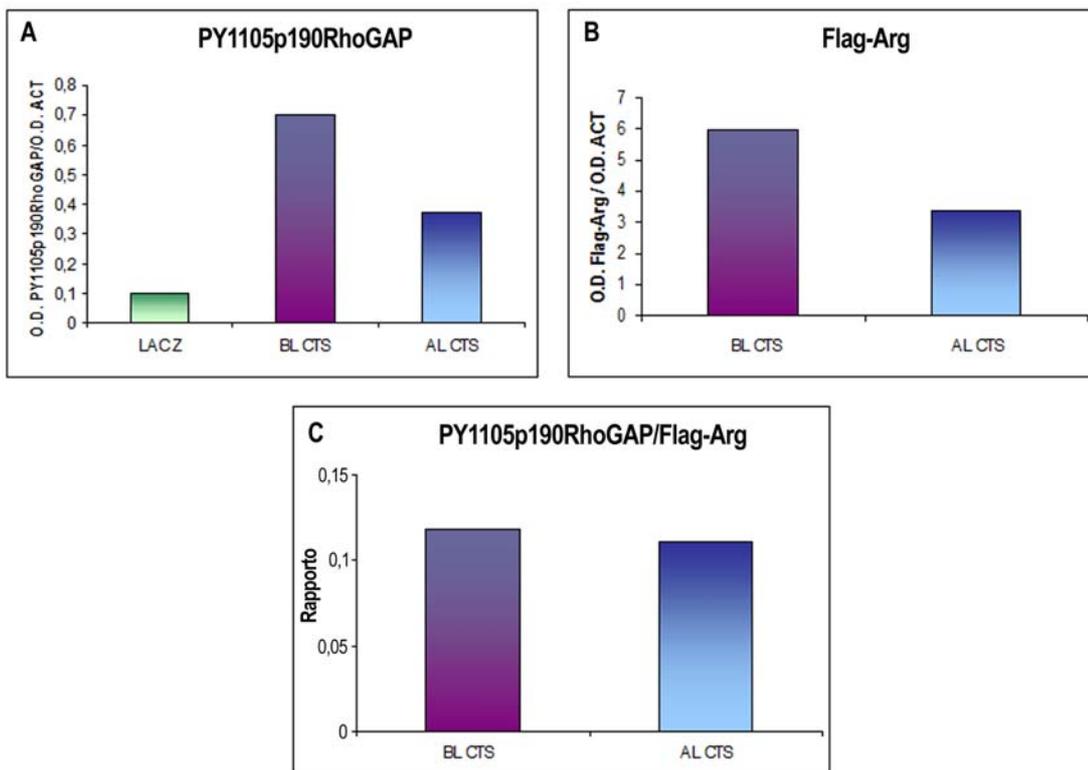


Figura 25: Analisi densitometrica delle bande proteiche corrispondenti a: A) p190RhoGAP fosforilato in Y1105 nei lisati di cellule di SH-SY5Y transfettate con le isoforme BLCTS e ALCTS e con il vettore controllo LAC Z e B) Flag-Arg C) è mostrato il rapporto quantitativo tra le bande di PY1105p190RhoGAP e Flag-Arg.

Studio del coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme ne differenziamento indotto nelle cellule SH-SY5Y con 0,01 μ M Abeta

Arg svolge un ruolo importante nel sistema nervoso e i dati riassunti in questa tesi dimostrano un suo coinvolgimento nella neuritogenesi indotta dalla stimolazione della linea cellulare SH-SY5Y con ATRA. Considerati inoltre i dati in letteratura che indicano un effetto neurotrofico dato dalla stimolazione con basse concentrazioni del peptide amiloidogeno A β (1-42) (Abeta) (Susen and Bloch 2005). Abbiamo deciso di stimolare le cellule della linea SH-SY5Y con oligomeri di Abeta ad una concentrazione di 0,01 μ M al fine di valutare l'eventuale coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme nel differenziamento indotto dal trattamento.

Le cellule della linea SH-SY5Y, trattate con il terreno di controllo (CTRL) per 24, 48 e 72 ore non hanno mostrato evidenti cambiamenti morfologici (figura 26). Quando però le cellule SH-SY5Y, piastrate nelle stesse condizioni, sono state trattate con oligomeri di Abeta [0,01 μ M] hanno sviluppato processi neuritici già dopo 24 ore (figura 26).

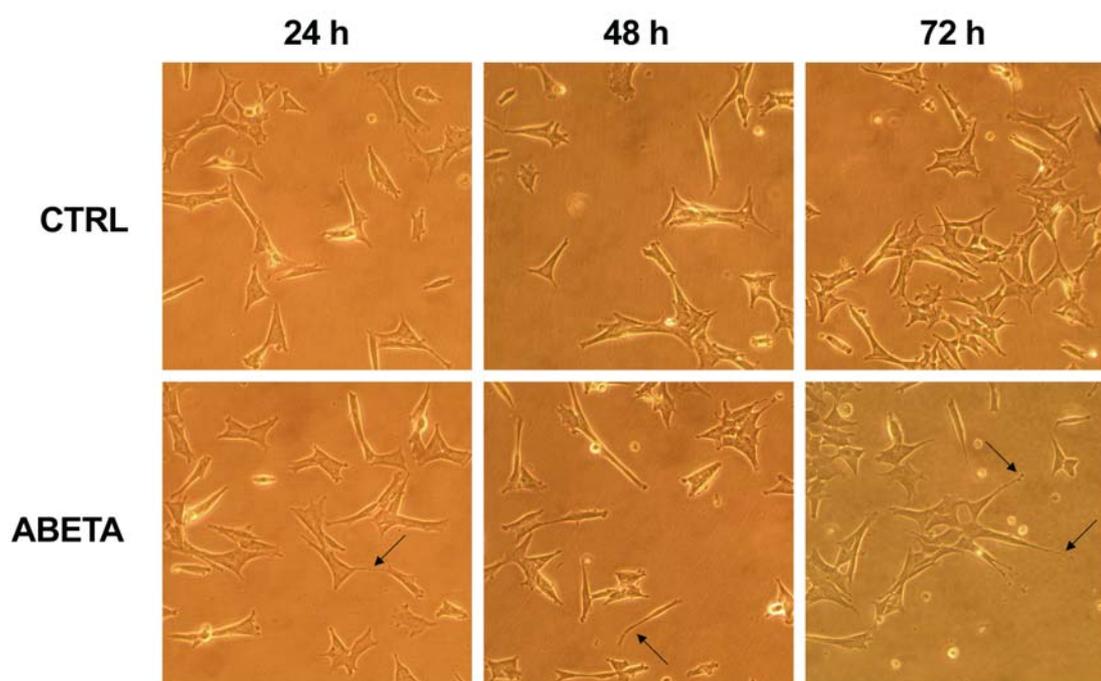


Figura 26: Cellule SH-SY5Y in coltura. Le immagini in contrasto di fase mostrano lo svilupparsi di processi neuritici (freccie nere) nelle cellule trattate con Abeta (ABETA), assenti nelle cellule controllo (CTRL), già dopo 24 ore di trattamento. 40X.

Questo dato è stato confermato dall'analisi in immunofluorescenza, dopo 72 ore di trattamento con 0,01 μM Abeta, utilizzando actina, tubulina e vimentina come marcatori del citoscheletro. Questo tipo di marcatura evidenzia la presenza di evidenti prolungamenti cellulari nelle cellule trattate (figura 27). Inoltre è stata eseguita anche la marcatura in immunofluorescenza per i neurofilamenti pesanti (NF-H) e anche in questo caso solo nelle cellule trattate con oligomeri di Abeta sono presenti prolungamenti NF-H positivi.

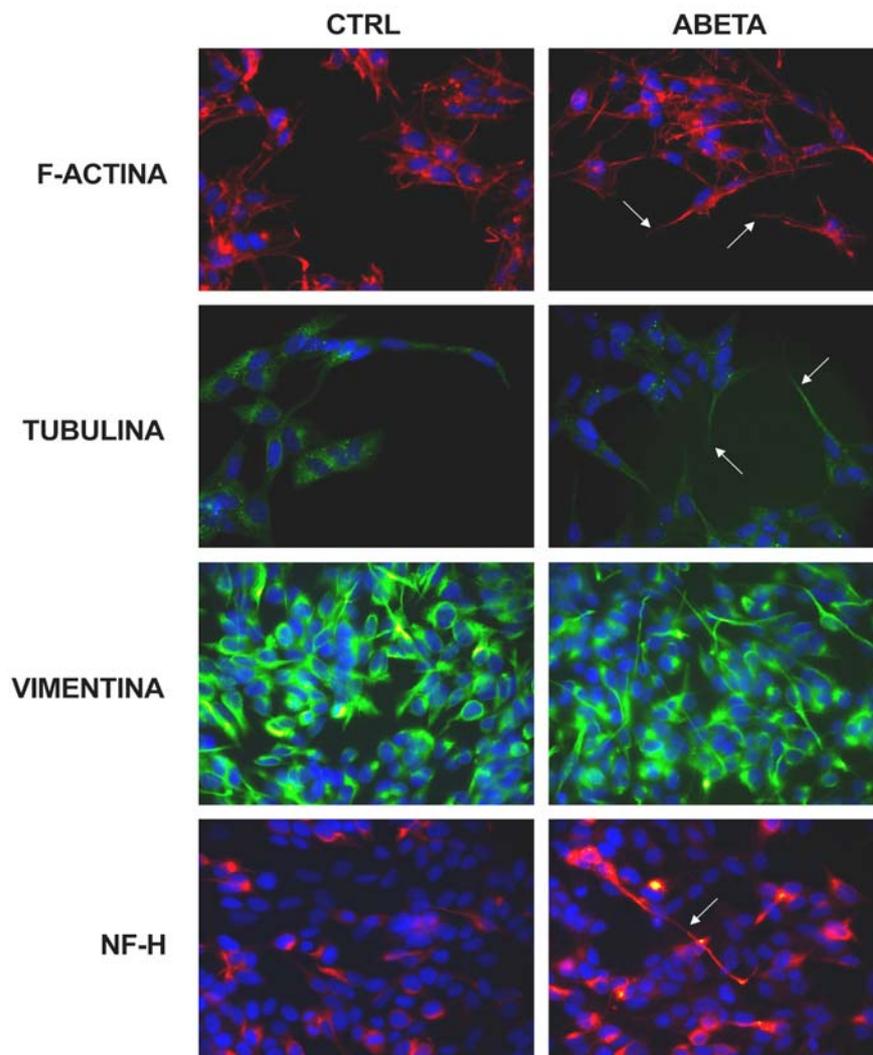


Figura 27: Analisi mediante immunofluorescenza di cellule SH-SY5Y dopo 72 ore di trattamento con 0,01 μM Abeta. Le frecce bianche mostrano i prolungamenti evidenziati usando i marcatori del citoscheletro actina, tubulina e vimentina e del differenziamento NF-H presenti nelle cellule trattate con Abeta (ABETA) e assenti nel controllo (CTRL). In blu sono stati colorati i nuclei (40X).

Allo scopo di quantificare gli effetti morfologici indotti dal trattamento con gli oligomeri di Abeta sulle cellule SH-SY5Y sono state analizzate le immagini in contrasto di fase delle cellule controllo e trattate per 24, 48 e 72 ore. La misurazione della lunghezza media dei neuriti, ottenuta dall'analisi di queste immagini, ha mostrato aumenti significativi ad ogni tempo analizzato nel trattato rispetto al controllo (figura 28). Dopo 48 ore di trattamento con Abeta si raggiunge il valore massimo di lunghezza dei neuriti di $27,1 \pm 0,46 \mu\text{m}$. Sulle stesse immagini in contrasto di fase è stato inoltre determinato il rapporto tra il numero di neuriti e il numero di corpi cellulari (figura 28). Anche in questo caso sono presenti differenze significative tra le cellule controllo, che mostrano mediamente un valore di circa 0,3 neuriti/cellula, e le cellule trattate, che mostrano mediamente valori superiori a 0,5 neuriti/cellula, ad ogni tempo analizzato (figura 28).

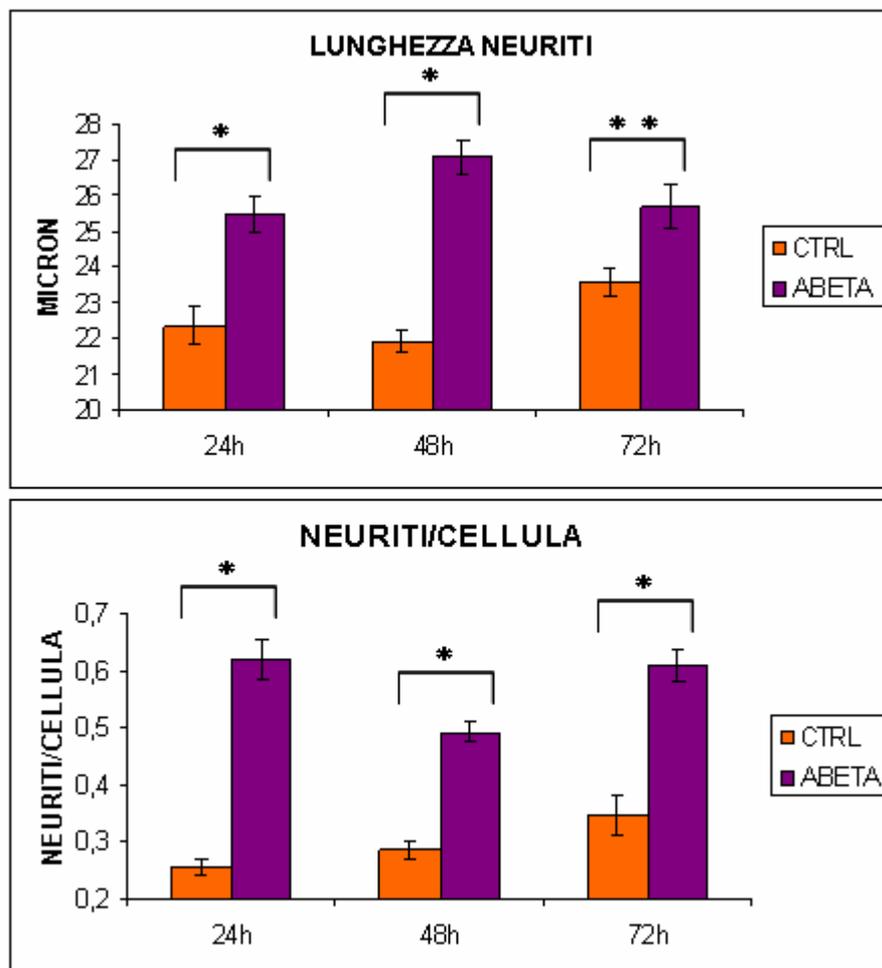


Figura 28: Quantificazione della lunghezza media dei neuriti e del numero di neuriti per cellula. Dati medi \pm S.E.M. ottenuti dalle immagini in contrasto di fase di 10 campi microscopici diversi e casuali di ogni piastra di cellule SH-SY5Y controllo (CTRL) o sottoposte a trattamento con oligomeri di Abeta (ABETA) per 24, 48 e 72 ore. (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$)

Una volta caratterizzato il nostro modello cellulare abbiamo valutato l'eventuale coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme nei cambiamenti morfologici indotti nelle cellule SH-SY5Y dal trattamento con oligomeri di Abeta. Pertanto l'RNA estratto dopo 24, 48 e 72 ore dalle cellule SH-SY5Y controllo e trattate è stato retrotrascritto con random primers e analizzato, mediante Real-Time PCR per quantificare il livello di espressione del trascritto totale di Arg e delle sue isoforme 5' e 3' (come indicato nella tabella 1 della sessione "materiali e metodi"). La quantificazione relativa del trascritto totale di Arg ha evidenziato un progressivo incremento nelle cellule trattate rispetto alle cellule controllo all'aumentare del tempo di trattamento (figura 29).

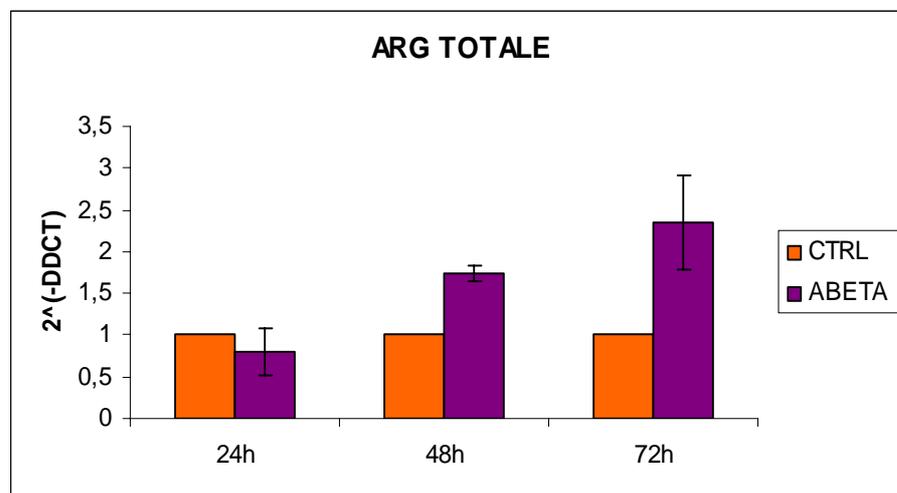


Figura 29: Quantificazione relativa tramite Real-Time PCR del livello totale del trascritto di Arg. I valori espressi come $2^{-\Delta\Delta CT}$ rappresentano il numero di volte in cui l'espressione totale del trascritto di Arg nel campione trattato con gli oligomeri di Abeta differisce rispetto al controllo, scelto per ogni tempo analizzato, come calibratore e posto uguale a 1. Dati medi \pm S.E.M di tre esperimenti indipendenti.

La quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle 4 isoforme 5' di Arg ha evidenziato ancora una volta l'assenza nelle cellule SH-SY5Y, sia nel controllo che dopo trattamento, delle isoforme A (figura 30). Tra le isoforme presenti la più espressa è l'isoforma BS sia nel campione controllo che trattato e questo pattern di espressione si mantiene a tutti i tempi considerati. La quantificazione delle isoforme 3' di Arg ha invece mostrato la presenza di tutte e due le forme CTL e CTS sia nelle cellule controllo che nelle cellule trattate ma è interessante notare che nelle cellule trattate si ha una prevalenza di espressione dell'isoforma "Long" (CTL) rispetto alla controparte "Short"

(CTS) al contrario di quanto succede nelle cellule controllo. La differenza di espressione tra queste due isoforme diventa sempre più evidente nei campioni trattati all'aumentare del tempo di trattamento.

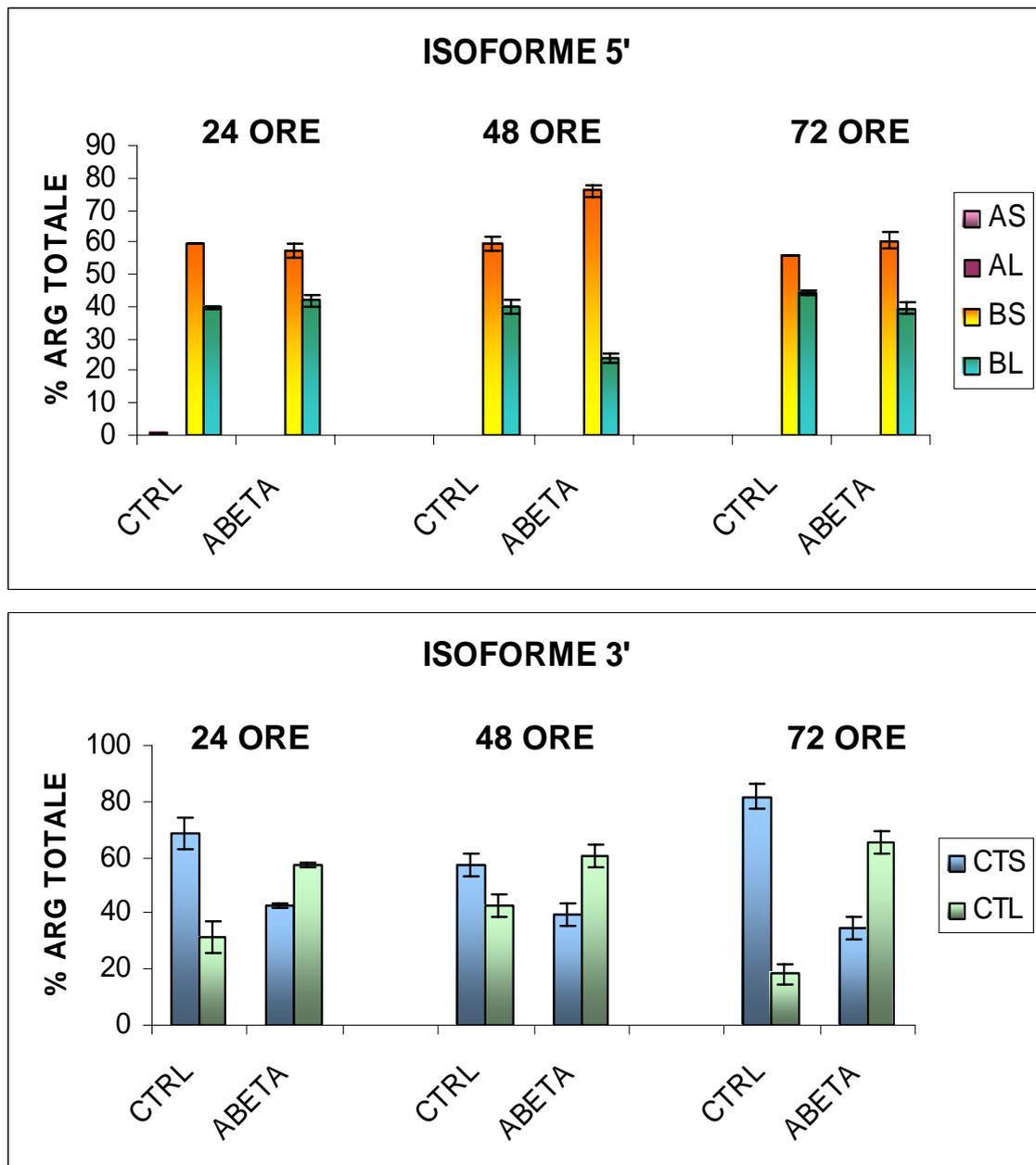


Figura 30: Quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg nella linea cellulare SH-SY5Y trattata con 0,01 μ M Abeta per 24, 48 e 72 ore. Le isoforme 3' mostrano nelle cellule trattate uno "switch" di espressione rispetto alle cellule controllo che diventa maggiormente evidente a 72 ore di trattamento. Dati medi \pm S.D. di tre esperimenti indipendenti.

Nello stesso modello cellulare abbiamo analizzato anche l'espressione della proteina Arg mediante 1-D western blot dei diversi lisati proteici ibridato con l'anticorpo specifico contro i domini SH₂ e SH₃ comuni a tutte le isoforme proteiche di Arg. I risultati ottenuti tramite western blot sono in accordo con i dati ottenuti tramite Real-Time PCR, infatti l'espressione di Arg aumenta nelle cellule trattate con oligomeri di Abeta in modo tempo-dipendente (figura 31).

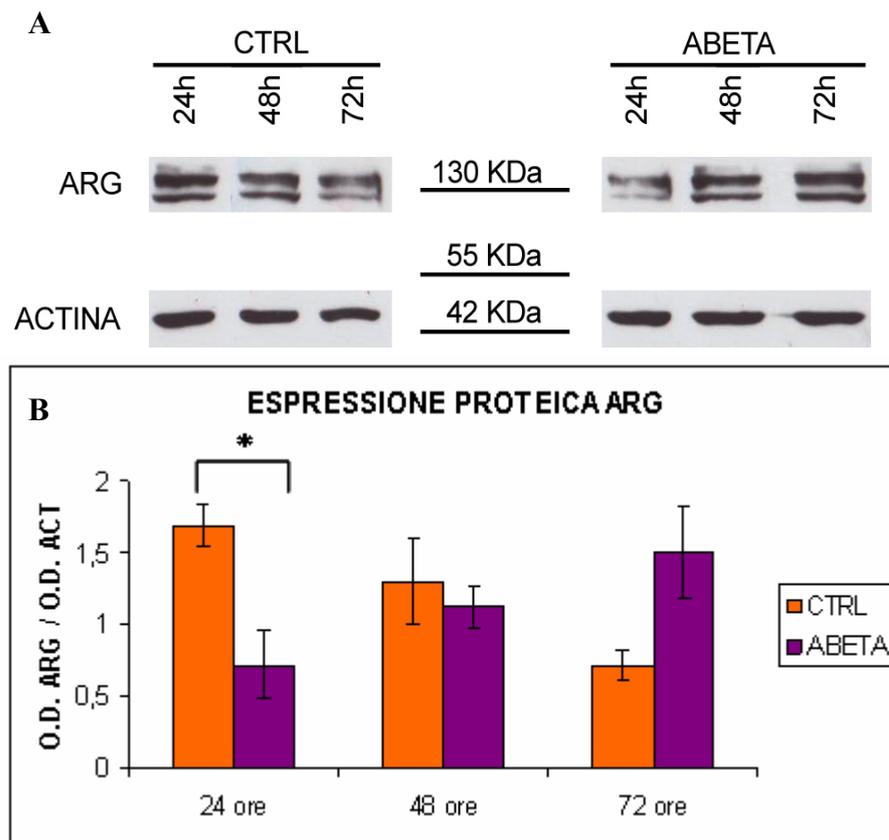


Figura 31: A) Western blot dei lisati delle cellule SH-SY5Y controllo e trattate con 0,01 μ M Abeta per 24, 48 e 72 ore. Sono stati caricati 20 μ g di lisato proteico totale per ogni campione. La parte superiore della membrana è stata ibridata con l'anticorpo anti-Arg, mentre la parte inferiore è stata ibridata con l'anticorpo anti-actina.

B) Analisi densitometrica delle bande proteiche di Arg. I valori sono espressi come densità ottica totale (O.D.) delle bande di Arg normalizzate per l'O.D. della rispettiva banda di actina. Dati medi \pm S.E.M di tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0,01$)

Anche in questo caso per meglio comprendere il ruolo di Arg nei cambiamenti morfologici indotti dal trattamento con oligomeri di Abeta abbiamo valutato, dopo 72 ore di trattamento, il livello di fosforilazione di p190RhoGAP nella tirosina Y1105

mediante western blot. Da questa analisi è emerso che, nonostante il livello proteico di Arg aumenti nelle cellule trattate non vi sono differenze nel livello di fosforilazione di p190RhoGAP nelle cellule trattate rispetto alle cellule controllo (figura 32).

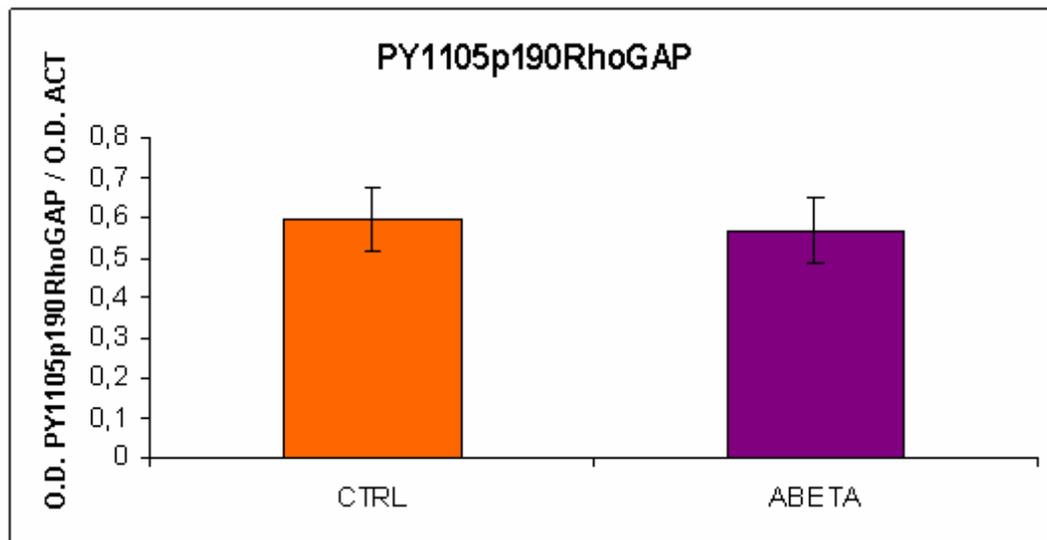


Figura 32: Analisi densitometrica della banda proteica di Y1105 di p190RhoGAP in cellule SH-SY5Y controllo e dopo 72 ore di trattamento con 0,01 μ M Abeta. I valori sono espressi come densità ottica (O.D.) della banda di PY1105p190RhoGAP normalizzata per O.D. della rispettiva banda di actina. Dati medi \pm S.E.M di tre esperimenti indipendenti.

Infine considerando l'elevata somiglianza strutturale di Arg e Abl e la loro ridondanza di funzione nello sviluppo del sistema nervoso e visto il coinvolgimento di Abl nel taglio proteolitico della proteina amiloide precursore (APP) abbiamo deciso di iniziare degli studi volti a determinare un'eventuale coinvolgimento anche di Arg nello stesso processo. Pertanto abbiamo valutato l'espressione di Arg e delle sue isoforme anche in sistemi cellulari periferici di Alzheimer come i fibroblasti, nei quali è dimostrata in letteratura la presenza delle stesse alterazioni metaboliche e molecolari che caratterizzano il tessuto cerebrale dei soggetti con malattia di Alzheimer. Dall'analisi mediante Real-Time PCR dell'RNA estratto da colture primarie di fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee prelevate da pazienti affetti da Alzheimer (AD) e da volontari sani (CTRL) è emerso che Arg è maggiormente espresso nei pazienti affetti da AD rispetto ai controlli (figura 33) anche se non c'è nessuna differenza importante nell'espressione delle isoforme 5' e 3' tra le due popolazioni cellulari analizzate (figura 34).

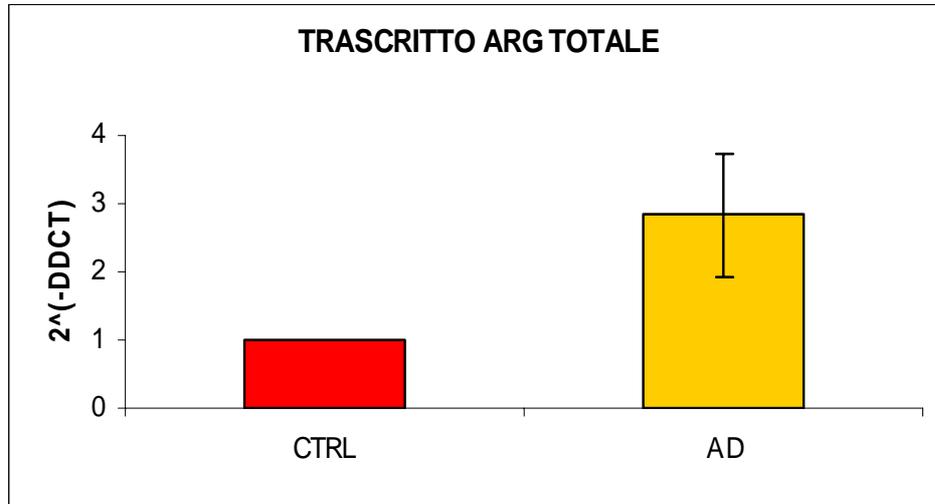


Figura 33: Quantificazione relativa tramite Real-Time PCR del livello totale del trascritto di Arg. I valori espressi come $2^{-\Delta\Delta CT}$ rappresentano il numero di volte in cui l'espressione del trascritto di Arg nei pazienti affetti da AD differisce rispetto al controllo, scelto come calibratore e posto uguale a 1. Dati medi \pm S.E.M di tre campioni indipendenti.

Infatti sia nei CTRL che negli AD sono presenti tutte le isoforme 5' di Arg, con una maggiore espressione dell'isoforma AS, che diventa ampiamente preponderante nei fibroblasti AD, e le 2 isoforme 3', con una maggiore espressione della forma "Short" (CTS) sia nei controlli che negli AD (figura 34).

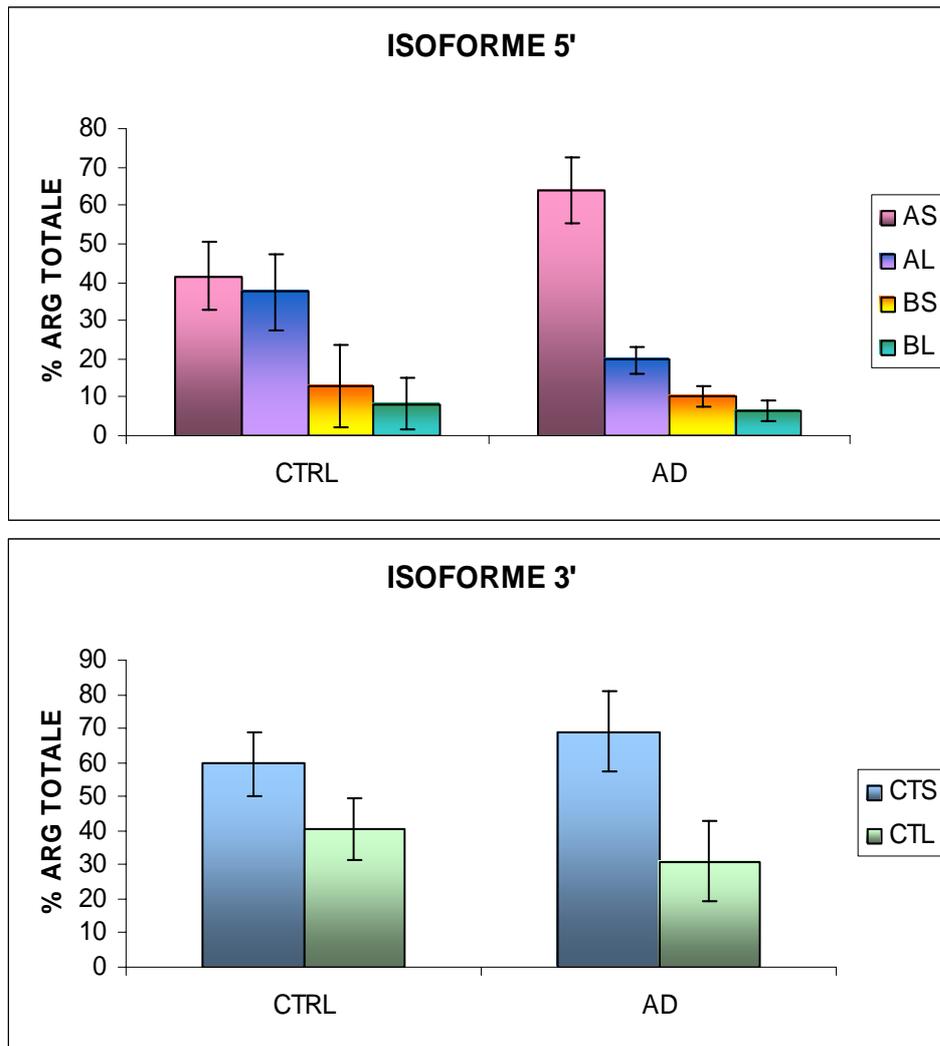


Figura 34: Quantificazione, mediante Real-Time PCR, delle estremità 5' e 3' dei trascritti di Arg, in fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee prelevate da pazienti con Alzheimer e da controlli sani. Il pattern di espressione delle isoforme di Arg non mostra differenze importanti tra le popolazioni cellulari analizzate. Dati medi \pm S.D. di tre campioni indipendenti.

DISCUSSIONE

Come ABL, anche il gene ARG, appartenente alla stessa sottofamiglia di tirosino chinasi non recettoriali, dà origine per splicing alternativo a diversi trascritti. Nei primi anni novanta ne erano stati descritti solo due, definiti A e B, differenti nell'estremità 5' in corrispondenza del primo esone (Kruh et al., 1990). Recentemente nel nostro laboratorio sono stati identificati, con metodiche di RT-PCR qualitativa, nuovi trascritti che predicono isoforme con diverse estremità 5' e 3' (Perego et al., 2005). Lo splicing alternativo dell'esone 2 di Arg, giustapposto all'esone 1A o 1B, produce trascritti con quattro diverse estremità 5': B-Long (BL); B-Short (BS); A-Long (AL); A-Short (AS). L'escissione alternativa di una sequenza di 309 bp all'estremità 3' di Arg produce due ulteriori isoforme definite come "Short" e "Long" (CTS e CTL). Combinando i diversi splicing descritti al 5' e al 3' era possibile ipotizzare l'esistenza di 8 diversi trascritti di Arg (ASCTS, ALCTS, ASCTL, ALCTL, BSCTS, BLCTS, BSCTL e, BLCTL). Per dimostrare l'effettiva esistenza di questi otto trascritti abbiamo prima dovuto valutare quale tra le diverse linee cellulari a disposizione nel nostro laboratorio fosse la più adatta allo scopo. Mediante Real-Time PCR abbiamo analizzato il pattern d'espressione delle diverse estremità 5' e 3' del trascritto di Arg nelle linee cellulari renali Hek 293T e Caki-1. Abbiamo così evidenziato che le estremità 5' sono tutte espresse solo nelle cellule Caki-1, nelle quali prevale l'isoforma BL, mentre nelle cellule Hek 293T, che esprimono solo le forme B, si ha una maggiore abbondanza del trascritto BS. Le isoforme delle estremità 3' invece sono espresse, anche se con rapporti quantitativi differenti, in entrambe le linee.

La linea cellulare Caki-1 è stata quindi utilizzata per dimostrare l'effettiva espressione dei trascritti corrispondenti alle 8 diverse isoforme di Arg utilizzando saggi di Long e Nested PCR. La presenza di amplificati della dimensione attesa per le diverse isoforme dimostra, in queste linea cellulare, l'effettiva espressione di tutti 8 i trascritti full-length di Arg predetti. La dimostrazione dell'esistenza di otto diverse isoforme di Arg può avere diverse interessanti implicazioni. L'ipotesi che queste isoforme abbiano un diverso ruolo funzionale è lasciato supporre anche dal fatto che il loro pattern di espressione varia in modo caratteristico nei diversi tipi cellulari. Il dominio C-terminale

di Arg, contenente due domini leganti l'actina, di cui uno viene parzialmente a mancare nelle isoforme CTS, potrebbe essere variamente responsabile delle diverse interazioni con la struttura citoscheletrica e, quindi, anche della possibile diversa sublocalizzazione cellulare delle isoforme. Le differenti estremità N-terminali potrebbero, invece, conferire alle corrispondenti isoforme attività enzimatica diversa (Hantschel et al., 2004) ed un coinvolgimento in differenti pathways metabolici. La combinazione delle estremità 5' e 3' nelle diverse isoforme potrebbe quindi favorire l'addensamento delle isoforme di Arg con attività chinasica regolata in modo differente in diverse zone cellulari o a ridosso di substrati specifici.

Una volta verificata l'esistenza degli 8 trascritti di Arg abbiamo cercato di valutarne il coinvolgimento in un modello di differenziamento neuronale *in vitro*, basandoci su dati in letteratura che vedono Arg coinvolto nella neuritogenesi e nella formazione e funzione delle sinapsi (Koleske et al., 1998). A questo scopo il pattern di espressione di Arg e delle sue isoforme è stato analizzato, tramite Real-Time PCR, nella linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, indotta al differenziamento mediante trattamento con 20µM ATRA. Le isoforme del gene Arg presentano un pattern di espressione dei trascritti specifico per i diversi tipi cellulari (Perego et al., 2005) e, in linea con questa osservazione, i risultati ottenuti in questa tesi evidenziano che nella linea cellulare SH-SY5Y, come nella linea HEK293T, le isoforme A sono assenti. Sono espresse solo le isoforme B con una prevalenza dell'isoforma BS rispetto alla controparte BL. Per quanto riguarda le isoforme all'estremità 3' invece, la quantificazione sempre mediante Real-Time PCR ha evidenziato una maggiore espressione della forma "Short" (CTS) rispetto alla "Long" (CTL). I dati da noi ottenuti sulle cellule SH-SY5Y avvalorano l'ipotesi del possibile coinvolgimento di Arg nei meccanismi di neuritogenesi attivati da ATRA su questa linea cellulare. Il trattamento, infatti, provoca una variazione dei parametri differenziativi, come l'incremento della lunghezza media dei neuriti, del numero di neuriti per cellula e l'espressione di marcatori neuronali come NF-H in questi neuriti ed è accompagnato da un incremento del livello del trascritto totale di Arg. È interessante il fatto che in seguito a trattamento con ATRA, sia nel nostro modello di differenziamento neuronale che durante l'induzione della differenziazione a granulocita della linea cellulare mieloide HL-60 (Perego et al., 2005), si abbia un incremento dei livelli di espressione del trascritto totale di Arg rispetto ai livelli riscontrati nelle corrispondenti cellule non trattate. Questo fa ipotizzare un coinvolgimento di Arg nei pathway molecolari dell'ATRA.

Dati in letteratura evidenziano il ruolo di Arg come promotore della neuritogenesi in cellule di neuroblastoma N2A (Hernandez et al., 2004b) per attivazione dell'inibitore di Rho p190RhoGAP, in seguito a fosforilazione Arg-dipendente della sua tirosina 1105 (Y1105). Infatti nei neuroni Rho ha in generale un effetto inibitorio sul prolungamento di assoni e dendriti (Luo et al., 2000). I dati mostrati in questa tesi sono in accordo con questi pubblicati da altri, infatti nelle cellule SH-SY5Y trattate con 20 μ M ATRA per 6 giorni, sebbene il livello proteico di Arg sia paragonabile a quello delle cellule controllo, il livello di p190RhoGAP fosforilato in Y1105 risulta aumentato, indice del fatto che il trattamento con ATRA induce in queste cellule per lo meno un aumento dell'attività chinasi di Arg. Nel modello di differenziazione neuronale da noi caratterizzato non si evidenzia nessuna variazione nel pattern di espressione delle diverse isoforme al 5' e 3' dei trascritti di Arg quindi per vedere se le diverse isoforme di Arg possono avere ruoli diversi nel differenziamento neuronale abbiamo approntato studi di tipo funzionale, valutando inizialmente la localizzazione subcellulare delle otto diverse isoforme full-length di Arg clonate nel vettore di espressione pFlagCMV2 e transfettate nella linea cellulare SH-SY5Y. La transfezione delle isoforme B valutabili (tutte tranne la BSCTS che ha dato problemi di efficienza nella transfezione del relativo costrutto) mostra una distribuzione omogenea delle proteine ricombinanti nel citoplasma cellulare e, in particolare, le isoforme BLCTL e BSCTL inducono nelle cellule transfettate l'acquisizione di una morfologia più rotondeggiante e una significativa diminuzione dello "spreading cellulare" rispetto alle cellule transfettate con il vettore controllo. L'isoforma BLCTS invece è tra le isoforme B quella che induce una maggiore produzione di protrusioni cellulari. Le isoforme A, normalmente assenti in questo tipo cellulare, quando transfettate nella linea SH-SY5Y, mostrano una distribuzione citoplasmatica non omogenea con addensamenti proteici a livello dei prolungamenti e soprattutto delle giunzioni cellulari. In particolare, in seguito a transfezione con l'isoforma ALCTS, le cellule mostrano un fenotipo ricco di estroflessioni di diversa lunghezza e spesso filopodiformi. Interessante è il fatto che le isoforme BLCTS e ALCTS che, quando over-esprese, inducono in modo più evidente la formazione di estroflessioni cellulari, sono strutturalmente simili. Infatti sebbene differiscano per l'esone 1 (A o B) esse mantengono l'esone 2 ("L") e perdono parte del primo sito di legame per l'actina (CTS). Dato il ruolo di Arg documentato in letteratura nel riarrangiamento del citoscheletro abbiamo voluto valutare l'effetto dell'over-espressione delle isoforme BLCTS e ALCTS sul citoscheletro di actina e tubulina.

Dalle analisi in immunofluorescenza è emerso che la transfezione delle due isoforme induce una distribuzione corticale dell'F-actina che colocalizza con Arg. Dati precedentemente riportati in letteratura (Wang et al., 2001) mostrano che i mutanti ottenuti per delezione, dell'intero primo dominio di legame per l'F-actina di Arg BLCTL perdono la capacità di colocalizzare con l'F-actina a livello corticale quando trasfettati in fibroblasti 3T3. I nostri dati dimostrano che la delezione, nelle isoforme CTS, di solo parte del primo dominio di legame all'F-actina non è invece sufficiente ad alterare questo pattern di colocalizzazione corticale.

Dall'analisi in immunofluorescenza delle cellule transfettate con le due isoforme BLCTS e ALCTS è inoltre emerso che quando nelle cellule SH-SY5Y viene over-espressa l'isoforma BLCTS la distribuzione della tubulina è paragonabile a quella delle cellule non transfettate, al contrario di quello che succede nelle cellule che over-esprimono l'isoforma ALCTS nelle quali la tubulina si accumula nel citoplasma dove colocalizza con Arg, ma diffonde anche nel nucleo. Il diverso effetto sulla distribuzione della tubulina potrebbe essere dovuto al differente esone 1 delle due isoforme transfettate. Infatti è noto che l'attività chinastica di Arg è inibita dalla regione "cap" N-terminale, costituita dai primi 80 residui aminoacidici codificati dal primo esone e parte del secondo, che interagisce con il dominio chinastico. Studi condotti sulla proteina mutata mancante di questa regione dimostrano che, in assenza di inibizione della regione "cap", incrementa l'autofosforilazione di Arg e quindi la sua attività chinastica (Hantschel et al., 2006). Inoltre la struttura secondaria della regione "cap" N-terminale può essere determinante nel regolare l'attività chinastica di Arg (Buffa et al., 2007). Questo significa che le diverse sequenze all'N-terminale (AS, AL, BS e BL) possono conferire alla regione "cap" una diversa struttura, modulando diversamente l'attività chinastica di Arg. Nelle cellule SH-SY5Y transfettate con l'isoforma ALCTS potrebbe essere quindi la regione "cap" di questa isoforma responsabile dell'alterata distribuzione della tubulina. Per verificare questa ipotesi saranno comunque necessari ulteriori e più approfonditi studi.

Dall'analisi in immunofluorescenza delle cellule SH-SY5Y transfettate con le isoforme BLCTS e ALCTS con la colorazione specifica per NF-H, un marcatore del differenziamento, è emerso che nelle cellule transfettate non sono presenti neuriti NF-H positivi. Questo dato è differente da quello ottenuto dalla stessa analisi condotta sulle cellule SH-SY5Y trattate per 6 giorni con 20 μ M ATRA; questa differenza è verosimilmente attribuibile al fatto che le cellule transfettate sono state fissate 24 ore

dopo la transfezione, un periodo di tempo troppo ridotto perché si avesse la formazione di prolungamenti NF-H positivi.

Date le sopra citate caratteristiche di Arg e il suo ruolo nel sistema nervoso centrale visto il ruolo di Abl nel taglio proteolitico del precursore della proteina amiloide (APP) e la neuritogenesi indotta dalle basse concentrazioni di Abeta abbiamo deciso di studiare il possibile coinvolgimento di Arg e delle sue isoforme anche nel differenziamento indotto da Abeta.

Pertanto le cellule della linea SH-SY5Y sono state stimulate con oligomeri di Abeta (1-42) 0,01 μ M per 72 ore e il trattamento ha indotto una variazione nei parametri differenziativi, come l'incremento della lunghezza media dei neuriti, del numero di neuriti per corpo cellulare e la formazione di neuriti NF-H positivi. Anche in questo caso Arg sembra coinvolto in questo fenomeno differenziativo, infatti l'analisi mediante Real-Time PCR e western blot ha mostrato un'over-espressione sia del trascritto che della proteina totale di Arg nelle cellule SH-SY5Y trattate con Abeta rispetto alle cellule controllo. Inoltre il pattern di espressione di Arg, analizzato tramite Real-Time PCR, non ha mostrato variazioni nel livello di espressione relativa delle estremità 5' nelle cellule trattate rispetto al controllo. Invece nelle cellule SH-SY5Y trattate con Abeta si ha una maggiore espressione del trascritto con estremità 3' di tipo CTL rispetto alla controparte CTS, al contrario di quanto succede nelle cellule controllo. L'analisi del livello di p190RhoGAP fosforilato in tirosina 1105 non mostra però nelle cellule trattate, dove si ha un aumento del livello della proteina Arg, una variazione rispetto alle cellule controllo. Questi dati fanno ipotizzare un coinvolgimento di Arg in un pathway di neuritogenesi p190RhoGAP-indipendente, diverso quindi da quello attivato dal trattamento con ATRA nelle cellule SH-SY5Y. Del resto è stato anche descritto che in cellule di neuroblastoma N2A la transfezione di Arg può indurre la neuritogenesi senza indurre inibizione di Rho e quindi attraverso un pathway p190RhoGAP-indipendente (Hernandez et al., 2004b). Studi ulteriori sono in corso per valutare il coinvolgimento di Arg in pathway alternativi a quelli di Rho nel processo di neuritogenesi indotto da Abeta.

Un'over-espressione del trascritto totale di Arg è stata dimostrata anche in colture primarie di fibroblasti prelevati da pazienti affetti da Alzheimer rispetto ai controlli sani. questo dato rappresenta il punto di partenza per studi futuri che mirino a definire il possibile coinvolgimento di Arg nel metabolismo della proteina precursore dall'amiloide APP. Ulteriori studi verranno eseguiti utilizzando concentrazioni

potenzialmente neurotossiche di Abeta (2,5 μ M) per stimolare le cellule SH-SY5Y al fine di valutarne l'effetto sull'espressione delle isoforme di Arg e sulla morfologia cellulare. Una maggiore comprensione della patogenesi delle placche amiloidee nell'Alzheimer potrà plausibilmente avere ricadute di tipo diagnostico e terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez A.R., Sandoval P.C., Leal N.R., Castro P.U., Kosik K.S. “*Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-beta-peptide and reactive oxygen species.*” *Neurobiol Dis.* (2004) **17**(2):326-36.
- Blaine Stine W., Dhalgren K., Krafft G. and LaDu M. “*In vitro characterization of conditions for Amyloid- β peptide oligomerization and fibrillogenesis*” *J. Biol. Chem.* (2002) **278**:11612-11622.
- Bolen J.B. “*Nonreceptor tyrosine protein kinases*”. *Oncogene* (1993) **8**:2025-2031.
- Boyle S.N., Michaud G.A., Schweitzer B., Predki P.F., Koleske A.J. “*A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation.*” *Curr. Biol.* (2007) **5**:445-51.
- Bradley W.D., Hernandez Settelman J., Koleske J. “*A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinase in PDGF-induced dorsal-wave formation*” *Curr. Biol.* (2007) **17**: 1-7.
- Brasher B. and Van Etten R.A. “*c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosine*” *J. Biol. Chem.* (2000) **275**:35631-35667.
- Buffa P., Manzella L., Consoli M.L., Messina A, Vigneri P. “*Modelling of the ABL and ARG proteins predicts two functionally critical regions that are natively unfolded.*Proteins” (2007) **67**(1):1-11.
- Cancino G.I., Toledo E.M., Leal N.R., Hernandez D.E., Yévenes L.F., Inestrosa N.C., Alvarez A.R. “*STI571 prevents apoptosis, tau phosphorylation and behavioural impairments induced by Alzheimer's beta-amyloid deposits*” *Brain* (2008) **131**:2425-42.
- Cantley L.C., Auger K.R., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R., Soltoff S. “*Oncogenes and signal transduction*” *Cell* (1991) **64**:281-302.
- Cao C., Leng Y., Huang W., Liu X. and Kufe D. “*Glutathione Peroxidase 1 Is Regulated by the c-Abl and Arg Tyrosine Kinases*” *J. Biol. Chem.* (2003d) **278**:39609–39614.
- Cao C., Leng Y., Kufe D. “*Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response*” *J. Biol. Chem.* (2003b) **278**:29667–29675.

- Cao C., Leng Y., Li C, et al. “*Functional interaction between the c-Abl and Arg protein-tyrosine kinases in the oxidative stress response*” J. Biol. Chem. (2003a) **278**:12961–12967.
- Cao C., Leng Y., Liu X., Yi Y., Li P. Kufe D. “*Catalase Is Regulated by Ubiquitination and Proteosomal Degradation. Role of the c-Abl and Arg Tyrosine Kinases*”. Biochem. (2003c) **42**:10348-10353.
- Cao C., Leng Y., Liu X., Yi Y., Li P. Kufe D. “*Ubiquitination and degradation of the Arg tyrosine kinase is regulated by oxidative stress*” Oncog. (2005) **24**:2433–2440.
- Cao C., Ren X., Kharbanda S., Koleske A.J., Prasad K.V.S., Kufe D. “*The ARG tyrosine kinase interacts with Siva-1 in the apoptotic response to oxidative stress*”. J. Biol. Chem. (2001) **276**:11465-11468.
- Cazzaniga G., Tosi S, Aloisi A., et al. “*The tyrosine kinase Ablrelated gene ARG is fused to ETV6 in an AML-M4Eo patient with a t(1;12)(q25;p13): Molecular cloning of both reciprocal transcripts*” Blood (1999) **94**:4370–4373.
- Chen W.S., Kung H.J., Yang W.K., and Lin W. “*Comparative tyrosine kinase profiles in colorectal cancers: Enhanced Arg expression in carcinoma as compared with adenoma and normal mucosa*”. Int. J. Cancer (1999) **83**:579–584.
- Cosen-Binker L.I., Kapus A. “*Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton*.” Physiology (2006) **21**:352-61.
- Creighton T.E. “*Proteins-structures and molecular properties*”. II edition W.H. Freeman and Company, New York (1993), pp. 78-100.
- Crnogorac T, Efthimiou E, Nielsen T, et al. “*Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas*”. Oncog. (2002) **21**:4587–4594.
- Dahlgren K.N., Manelli A.M., Stine W.B., Baker L.K., Krafft G.A., LaDu M.J. “*Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability*” J. Biol. Chem. (2002) **35**:32046-53.
- Encinas M., Inglesias M., Liu Y., Wang Y., Muhaisen A., Cena V., Gallego C. and Comella J.X. “*Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and Brain-Derived-Neurotrophic Factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor dependent, human neuronal like cells*”. J. Neurochem. (2000) **75**:991-1003.
- Feller S.M., Ren R., Hanafusa H., Baltimore D. “*SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl*” Trends Biochem. Sci. (1994) **19**:453-458.
- Finn A., Feng G., Pendergast A. M. “*Postsynaptic requirement for Abl kinases in assembly neuromuscular junction*” Nat. Neuros. (2003) **6**:717-723.

- Galkin V.E., Orlova A., Koleske J. and Egelman E.H. “*The Arg non-receptor tyrosine kinase modifies F-actin structure*” J.Mol. Bio. (2005) **346**:565-575.
- Griensinger F., Janke A., Podlenschny M., et al. “*Identification of an ETV6-ABL2 fusion transcript in combination with an ETV6 point mutation in a T-cell acute lymphoblastic leukaemia cell line*”. Br. J. Haematol. (2002) **119**:454–458.
- Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. “*The protein kinase family : conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*”. Science (1988) **241**:42-52.
- Hanzschel O. and Superti-Furga G. “*Regulation of c-ABL and BCR-ABL tyrosine kinases*” Mol. Cell Biol. (2004) **5**:33-44.
- Héraud C., Hilairet S., Muller J.M., Leterrier J.F., Chadéneau C. “*Neuritogenesis induced by vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and peptide histidine methionine in SH-SY5y cells is associated with regulated expression of cytoskeleton mRNAs and proteins*” J. Neur. Res. (2004) **3**:320-9.
- Hernandez S.E., Krishnaswami M., Miller A.L. and Koleske A.J. “*How do Abl family kinases regulate cell shape and movement?*” Trends in Cell Biol.(2004a) **1**:36-44.
- Hernandez S.E., Settleman J., Koleske A.J. “*Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase*” Curr. Biol. (2004b), **14**:691–696.
- Herskovits J.S., Shpetner H.S., Burgess C.C, Vallee R.B. “*Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain.*” Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1993) **90**:11468–11472.
- Iijima Y., Ito T., Oikawa T., et al. “*A new ETV6/TEL partner gene, ARG(ABL-related gene or ABL2 identified in an AML-M3 cell line with a t(1;12)(q25;p13) translocation*” Blood (2000) **95**:2126–2131.
- Iijima Y., Okuda K., Tojo A., et al. “*Transformation of Ba/F3 cells and Rat-1 cells by ETV6/ARG*” Oncogene (2002) **21**:4374–4383.
- Kain K.H. and Klemke R.L. “*Inhibition of Cell Migration by Abl Family Tyrosine Kinases through Uncoupling of Crk-CAS Complexes*”. J. Biol. Chem.(2001) **276**:16185–16192.
- Koleske A.J., Gifford A.M., Scott M.L., Nee M., Bronson R.T., Miczek K.A., Baltimore “*Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation*” Neuron (1998) **21**:1259-1272.
- Kruh G.D., King C.R., Kraus M.H., Popescu N.C., Amsbaugh S.C., McBride Aaronson S.A. “*A novel human gene closely related to the abl proto-oncogene*” Science” (1986) **234**:1545-1548.

- Kruh G.D., Perego R., Miki T., Aaronson S.A. “*The complete coding sequence of arg defines the Abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinase*”. Proc. Natl. Acad. Sci (1990) **87**:5802-5806.
- Kumar S., Bharti A., Mishra N., Kharbanda S., Saxena S. and Kufe D. “*Targeting of the c-Abl Tyrosine Kinase to Mitochondria in the Necrotic Cell Death Response to Oxidative Stress*”. J. Biol. Chem. (2001) **276**:17281-17285.
- Lapetina S., Mader C.C., Machida K., Mayer B.J., Koleske A.J. “*Arg interacts with cortactin to promote adhesion-dependent cell edge protrusion*.” J. Cell Biol. 2009 **185**(3):503-19.
- Liu X., Huang W., Li C., Li P., Yuan J., Li X., Qiu XB., Ma Q., Cao C. “*Interaction between c-Abl and Arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation*” Mol. Cell (2006) **3**:317-327.
- Livak J.L. and Schmittgen T.D. “*Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method*”. Methods (2001) **25**:402-408.
- Meric F., Lee W.P., Sahin A et al. “*Expression profile of tyrosine kinase in breast cancer*” Clin. Cancer Res. (2002) **8**:361-367.
- Miller A.L., Wang Y., Mooseker M.S. and Koleske A.J. “*The Abl-related gene (Arg) requires its F-actin–microtubule cross-linking activity to regulate lamellipodial dynamics during fibroblast adhesion*”. J. Cell Biol. (2004) **165**:407–419.
- Moresco E. Y., Donaldson S., Williamson A., Koleske J. ”*Integrin mediated branch maintenance requires Abelson family kinase*“ J. Neurosc. (2005) **26**:6105-6118.
- Moresco E.M.Y., Scheetz A.J., Bornmann W.G., Koleske A.J., and Fitzsimond R.M. “*Abl Family Nonreceptor Tyrosine Kinases Modulate Short-Term Synaptic Plasticity*” J. Neurophysiol. (2003b) **89**:1678–1687.
- Moresco E.M.Y. and Koleske A.J. “*Regulation of neuronal morphogenesis and synaptic function by Abl family kinases*”. Curr. Opinion Neurob. (2003) **13**:535–544.
- Mysliwiec T., Perego R.A., and Kruh G.D. “*Analysis of chimeric Gag-Arg/Abl molecules indicates a distinct negative regulatory role for the Arg C-terminal domain*” Oncogene (1996) **12**:631-640.
- Nagar B. et al. “*Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase*” Cell (2003) **112**:859–871.
- Okuda K., Oda A., Sato Y. et al. “*Signal transduction and cellular functions of the TEL/ARG oncoprotein*” Leukemia (2005) **19**:603-610.
- Okuda K., Weisberg E., Gilliland D., Griffin J.D. “*Arg tyrosine kinase activity is inhibited by STI571*”. Blood (2001) **97**:2440-2448.

- Pawson T. "Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases : regulatory elements in signal transduction" *Oncogene* (1988) **3**:491-495.
- Pawson T., Gish G.D. "SH2 and SH3 domains:from structure to function" *Cell* (1992) **71**:359-362.
- Peacock J.G., Miller A.L., Bradley W.D., Rodriguez O.C., Webb D.J., Koleske A.J. "The Abl-related gene tyrosine kinase acts through p190RhoGAP to inhibit actomyosin contractility and regulate focal adhesion dynamics upon adhesion to fibronectin". *Mol. Biol. Cell.* 2007 **10**:3860-72.
- Pendergast A. M. "The Abl family kinases mechanisms of regulation and signalling". *Adv. Cancer Res.* (2002) **89**:51-98.
- Perego R.A., Bianchi C., Brando B., et al "Increment of non receptor tyrosine kinase Arg RNA as evaluated by semiquantitative RT-PCR in granulocyte and macrophage-like differentiation of HL-60 cells" *Exp. Cell. Res.* (1998) **245**:146-154.
- Perego R.A., Corizzato M., Bianchi C., Eroini B. and Bosari S. "N- and C-Terminal Isoforms of Arg Quantified by Real-Time PCR Are Specifically Expressed in Human Normal and Neoplastic Cells, in Neoplastic Cell Lines, and in HL-60 Cell Differentiation". *Molec. Carcinog.* (2005a) **42**:229–239.
- Perego R.A., Ron D., Kruh G.D. "Arg encodes a widely expressed 145 kDa protein-tyrosine kinase" (1991) **6**:1899-1902.
- Perkinton M.S., Standen C.L., Lau K.F., Kesavapany S., Byers H.L., Ward M., McLoughlin D.M., Miller C.C. "The c-Abl tyrosine kinase phosphorylates the Fe65 adaptor protein to stimulate Fe65/amyloid precursor protein nuclear signaling." *J. Biol. Chem.* (2004) **279**:22084-91.
- Plattner R., Kadlec L., DeMali K.A., Kazlauskas A. and Pendergast A.M. "c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF" *Genes and Development* (1999) **13**:2400-2411.
- Plattner R., Koleske A.J., Kazlauskas A. and Pendergast A.M. "Bidirectional Signaling Links the Abelson Kinases to the Platelet-Derived Growth Factor Receptor". *Molec. Cell. Biol.*(2004) **24**:2573–2583.
- Pluk H., Dorey K., Superti-Furga G. "Autoinhibition of c-abl" *Cell* (2002) **108**:247-259.
- Ren R. "Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia" *Nat. Rev. Cancer.* 2005 **3**:172-83.
- Ren R., Mayer B.J., Cicchetti P., Baltimore D. "Identification of a ten - amino acid proline - rich SH3 binding site". *Science* (1993) **259**:1157-1161.

- Rickles R.J., Botfield M.C., Weng Z., Taylor J.A., Green O.M., Brugge J.S., Zoller M.J. "Identificazion of *Src*, *Fyn*, *PI3K* and *Abl SH3* domain ligands using phage display libraries". *Embo J.* (1994) **13**:5598-5604.
- Robinson D.R., Wu Y.M., Lin S.F. "The protein tyrosine kinase family of the human genome" *Oncogene* (2000) **19**:5548-5557.
- Sasaki H., Ide N., Yukiue H, Kobayashi Y., Fukai I., Yamakawa Y. and Fujii Y. "Arg and DAP3 expression was correlated with human thymoma stage". *Clin. Experim. Metastasis* (2004) **21**:507-513.
- Sfakianos M.K., Eisman A., Gourley S.L., Bradley W.D., Scheetz A.J., Settleman J., Taylor J.R., Greer C.A., Williamson A., Koleske A.J. "Inhibition of Rho via Arg and p190RhoGAP in the postnatal mouse hippocampus regulates dendritic spine maturation, synapse and dendrite stability, and behavior." *J. Neurosci.* (2007) **41**:10982-92.
- Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Roe B.A., Canaani E. "Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *Abl* gene and from the *Bcr-Abl* fused gene" *Cell* (1986) **47**:277-284.
- Spengler B.A., Biedler J.L. and Ross R.A. "A corrected karyotype for the SHSY-5Y human neuroblastoma cell line". *Cancer Genet. Cytogenet.* (2002) **138**:177-178.
- Srinivasan A. and Plattner R. "Activation of *Abl* tyrosine kinase promotes invasion of aggressive Breast Cancer Cells" *Cancer Res.* (2006) **66**:5648-5655.
- Srinivasan D., Kaetzel D.M. Plattner R. "Reciprocal regulation of *Abl* and receptor tyrosine kinases". *Cell Signal.* (2009) **7**:1143-50.
- Sun X., Majumder P., Shioya H., Wu F., Kumar S., Weichselbaum R., Kharbanda S. and Kufe D. "Activation of the Cytoplasmic *c-Abl* Tyrosine Kinase by Reactive Oxygen Species". *J. Biol. Chem.* (2000) **275**:17237-17240.
- Susen K. and Blöchl A. "Low concentrations of aggregated β -amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75" *J. Mol. Med.* (2005) **83**: 720–735.
- Tybulewicz V.L.J., Crawford C.E., Jackson P.K., Bronson R.T., Mulligan R.C. "Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *c-abl* proto-oncogene." *Cell* (1991) **65**:1153-1163.
- Wang B., Mysliwiec T., Kra inc D., Jensen R.A., Sonoda G., Testa J.R., Golemis E.A.,Kruh G.D. "Identification of ArgBP1, an Arg protein tyrosine kinase binding protein that is the human homologue o f a CNS-specific enopus gene." *Oncogene* (1996) **12**:1921-1929.
- Wang Y. "Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation" *Curr. Op. Genet. Dev.*(1993) **3**:35-43.

- Wang Y., Miller A.L., Mooseker M.S, Koleske A.J. “*The Abl-related gene (Arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin*”. Proc. Natl. Acad. Sci. (2001) **98**:14865–14870.
- Woodring P.J., E. David Litwack, Dennis D.M. O’Leary, Ginger R. Lucero, Jean Y.J. Wang, and Hunter T.. “*Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension*” J. Cell Biol. (2002) **156**:879–892.
- Yankner BA. “*The pathogenesis of Alzheimer's disease. Is amyloid beta-protein the beginning or the end?*” Ann. N. Y. Acad. Sci. (2000) **924**:26-8.
- Zambrano N., Bruni P., Minopoli G., Mosca R., Molino D., Russo C., Schettini G., Sudol M., Russo T. ”*The beta-amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene.*” J. Biol. Chem. (2001) **276**:19787-92.
- Zukerberg L.R., Patrick G.N., Niko Vidal M., Van Etten R.A., Tsai L.H. “*Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth*”. Neuron (2000) **26**:633-646.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questa tesi ed in particolare:

Il prof. Perego e la Dott. Bianchi per avermi offerto l'opportunità di partecipare al dottorato in Tecnologie Biomediche e per i preziosi consigli.

Le persone con cui ho condiviso la vita di laboratorio ed in particolare Lara, Grazia e Vitalba per essere state delle amiche più che delle colleghe.

La mia famiglia per avermi sempre sostenuto e incoraggiata a dare il meglio di me.

Alessandro, il mio mostriattolo, per essere il sale ma soprattutto lo zucchero della mia vita... ti voglio bene.

Illa per il sottotetto amichevole, le cene, le chiacchierate infinite, le risate... mi manchi

Moreno per non aver mai dubitato di me, per l'affetto e per il tempo passato insieme... avrai sempre un posto speciale.

Paola, per l'affetto, il supporto morale e per essere sempre stata incondizionatamente dalla mia parte.

Davide per l'impareggiabile consulenza grafica, ma soprattutto per avermi fatto spazio sotto il suo ombrello quel lontano giorno di pioggia in cui tutto è cominciato.