



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

Curriculum Tecnologie Biologiche

The role of cyclase-associated protein (CAP1) in serum response factor (SRF)-dependent gene expression regulation

Il ruolo della proteina associata alle ciclasi (CAP1) nella regolazione dell'espressione genica dipendente dal fattore di risposta al siero (SRF)

Tesi di Laurea Magistrale di:

Dalila Colombaretti

Relatore Chiar.ma Prof.ssa:

Anna La Teana

Correlatore:

Prof. Daniele Di Marino

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2018/2019

Alla mia nonna Angela

INDICE

<u>SCOPO</u>	Pg.5
<u>INTRODUZIONE:</u>	Pg.8
1. Cenni sulla morfogenesi neuronale	Pg.9
2. L'actina	Pg.12
2.1 Actin binding protein (ABP)	Pg.16
2.1.1 La profilina	Pg.17
2.1.2 ADF\Cofilina	Pg.18
3. CAP, Proteina associata alle ciclasi	Pg.20
3.1 Generalità	Pg.21
3.2 Struttura	Pg.23
3.3 L'attività	Pg.26
3.3.1 CAP agisce come monomero?	Pg.27
3.3.2 Meccanismo molecolare	Pg.29
4. SRF: fattore di risposta sierica	Pg.34
4.1 SRF nei neuroni	Pg.42
4.2 MRTF, un cofattore importante	Pg.42
<u>MATERIALI E METODI:</u>	Pg. 50
6. Metodi di cultura cellulare: linee murine e linee umane	Pg.51
6.1 linee cellulari	Pg.51
7. Vettore pSUPER	Pg.52
7.1 pSUPER 3.1	Pg.52
7.2 shRNA	Pg.54

7.3 Protocollo di clonaggio	Pg.55
7.4 Midi Pep	Pg.62
8. Trasfezione	Pg.63
9. Western blot	Pg.67
10. Co-IP	Pg.71
11. Pull Down	Pg.75
11.1 Colloidal Staining	Pg.75
12. Software d'immagine	Pg.79
<u>RISULTATI:</u>	Pg.81
13. Attività di CAP1 in cellule non neuronali	Pg.82
13.1 Silenziamento espressione di CAP1 e analisi	Pg.82
14. Fattori interagenti con CAP1	Pg.87
14.1 Co-IP	Pg.87
14.2 Pull Down	Pg.89
14.3 Analisi morfologica-dendritica in neuroni CAP1 KO	Pg.92
<u>DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE</u>	Pg.96
<u>RINGRAZIAMENTI</u>	Pg.99
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	Pg.112

SCOPO

La comprensione dei processi molecolari che sono alla base di alcune malattie neurologiche quali Sindrome del X Fragile, sindrome di Angelman, Sindrome di Down, caratterizzate, a livello neuronale da una alterata morfologia delle spine dendritiche, è essenziale per capire l'origine di queste patologie e potrebbe contribuire a mettere a punto nuove strategie terapeutiche e preventive. Lo scopo del mio lavoro di tesi, svolto presso il Dipartimento di Biochimica e Farmacologia dell'Università di Marburgo (Germania, laboratorio AG Rust), è stato quello studiare, in linee cellulari non neuronali *in vitro*, come HeLa, HEK, m-Hypo, NIH3T3 e HT-22, del ruolo della proteina associata alle ciclastasi (CAP isoforma 1) come fattore legante l'actina e le sue potenziali implicazioni nel pathway cellulare del fattore SRF, un fattore responsabile della regolazione dell'espressione di geni coinvolti nella modulazione della morfologia e proliferazione cellulare. A questo scopo sono state pertanto usate tecniche di Western Blot, Luciferasi Assay, Co-Immunoprecipitazione e Pull Down. Inoltre, è stata effettuata l'analisi morfologica di dendriti in neuroni ippocampali murini CAP1 KO tramite l'utilizzo di un microscopio confocale ZEISS LSM5 Pascal.

Il chiarimento della funzionalità di CAP1 e dei pathway nei quali è coinvolta, potrebbe far luce sui meccanismi che portano ad un disequilibrio del citoscheletro cellulare e quindi anche delle patologie correlate, sia a livello

neuronal che tumorale. Il presente progetto di tesi ha l'obiettivo di chiarire i meccanismi molecolari della proteina CAP 1 in colture di cellule non neuronali, in modo tale da avere un modello di studio.

INTRODUZIONE

1.Cenni sulla morfogenesi neuronale

L'importanza della morfologia neuronale per le funzionalità encefaliche, è ben nota da più di 100 anni. I neuroni sono dotati di un corpo cellulare, di uno o più assoni e dendriti che sono strutture altamente specializzate. L'importanza di queste strutture ramificate è sottolineata dalla loro ampia diversità morfologica all'interno delle regioni cerebrali. Nel sistema nervoso centrale (SNC), la forma dell'albero dendritico è correlata alla specificità del tipo di cellula e al gran numero di input sinaptici. Inoltre, l'estensione di questi, nei neuroni sensoriali del sistema nervoso periferico, definisce fisicamente i loro campi ricettivi mentre la topologia assonale influenza l'output sinaptico. È pertanto essenziale arrivare alla conoscenza della relazione struttura-funzione per rispondere a molti quesiti nelle neuroscienze a tutti i livelli di indagine. Pertanto, lo studio della morfologia assonale e dendritica svolge un ruolo principale nella ricerca dell'attività e della funzione neuronale. Durante lo sviluppo encefalico, i neuroni attraversano fasi successive di differenziazione morfologica intimamente legate alla motilità cellulare. Le alterazioni dinamiche dei microfilamenti di actina insieme ad altri componenti citoscheletrici (in particolare i microtubuli) forniscono un meccanismo cellulare essenziale per garantire processi come: la migrazione delle cellule neuronali, l'espansione dei neuriti, la crescita dell'assone e

dendriti, ed il targeting sinaptico durante le fasi iniziali. I dendriti sono in origine privi di spine e sinapsi, queste protrusioni dinamiche, simili a dita che, iniziano a formarsi durante il periodo della sinaptogenesi e hanno la capacità di formare sinapsi nascenti con assoni vicini. Le spine dendritiche mature in soggetti sani sono in genere meno di $3\mu\text{m}$ di lunghezza, sono costituite da una testa sferica ($0,5-1,5\mu\text{m}$) che funge da compartimento biochimico ed è collegato al dendrite “genitore” da un collo sottile ($<0,5\mu\text{m}$ di diametro) pensato per funzionare come una barriera diffusionale per organelli intracellulari, così come per ioni di segnalazione e molecole (Fig.1). La morfologia delle spine può variare in lunghezza complessiva, forma della testa, lunghezza del collo così come nei rapporti dei recettori e proprietà diffusionali; e durante i vari stadi di sviluppo queste variano la loro densità e morfologia come anche nell’adulto. È stato riscontrato che in alcune malattie neurologiche, come la Sindrome di Down, Sindrome del X fragile , sindrome di Ratt, sindrome di Angelman, e sclerosi tuberosa, il numero e la morfologia delle spine dendritiche è alterato [1] (Fig. 1,2).

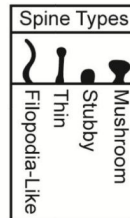


Fig 1. Morfologie non comuni di spine dendritiche. Da da destra: morfologia a fungo, tozze senza collo evidente, sottili con collo poco pronunciato e spine con un lungo ma sottile collo e testa poco pronunciata.

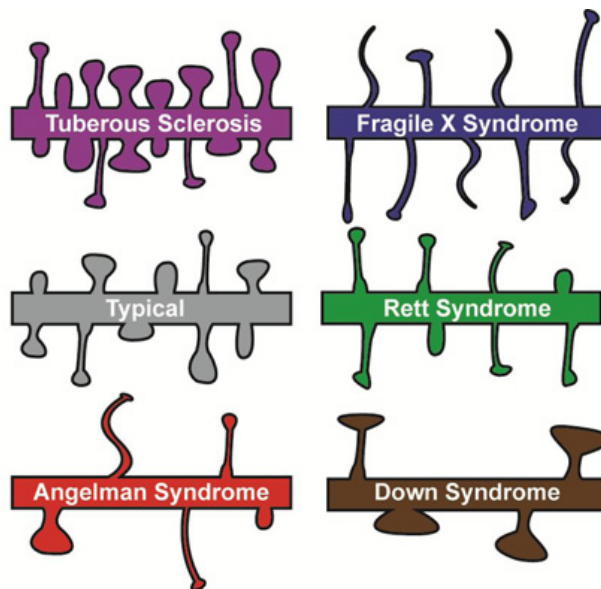


Fig.2 Spine dendrite riscontrate in soggetti affetti da malattie neuropsicologiche.

Nel sistema nervoso adulto, i cambiamenti strutturali durante la generazione di nuove sinapsi e la loro modulazione nella plasticità sinaptica richiedono pertanto proprietà dinamiche del citoscheletro. È bene sottolineare che, l'actina globulare (G-actina) è perlopiù presente a livello dell'area centrale del cono di crescita neuronale, mentre l'actina filamentosa (F-actina) è maggiormente distribuita nelle aree periferiche di questo [2].

2. L'actina:

L'actina è la proteina più abbondante nella maggior parte delle cellule eucariotiche, è altamente conservata tra gli organismi e partecipa a più interazioni proteina-proteina di qualsiasi altra proteina conosciuta, infatti l'actina è essenziale per una vasta gamma di funzioni cellulari. Tutte queste funzioni sono a carico delle varie isoforme esistenti di questa proteina. L'interazione molecolare tra actina e ABP (actin binding protein) regola molteplici aspetti della motilità cellulare, un elenco parziale comprende: la divisione cellulare, la migrazione, la formazione di giunzioni, il rimodellamento della cromatina, la regolazione della trascrizione, il traffico di vescicole, la regolazione della morfologia cellulare, della comunicazione cellula-cellula e matrice cellulare (ad esempio, adesioni focali, cadherine) [4]. Queste proprietà, insieme alla sua capacità di transizione tra gli stati monomerici (G-actina) e filamentosi (F-actina) sotto il controllo di idrolisi

Pagina 12

nucleotidica, ioni, e un gran numero di proteine leganti l'actina, rendono questa proteina un giocatore essenziale in molte funzioni cellulari. Le isoforme di actina presenti nei vertebrati vengono codificate da sei geni differenti, quattro di queste, sono espresse: nel tessuto del muscolo liscio (α / γ -isoforme), nel cardiaco (α -isoforma) e nello scheletrico (α -isoforma). Le restanti due isoforme, β -actina-citoplasmatica e γ -actina-citoplasmatica sono invece ubiquitarie. Le isoforme dell'actina differiscono solo per pochi aminoacidi soprattutto a livello dell'estremità N-terminale. L'actina subisce anche varie forme di modificazioni post-traduzionali. Da un punto di vista strutturale viene divisa in 4 sottodomini denominati rispettivamente da uno a quattro [3]. La migrazione cellulare è un evento altamente regolato che ha un ruolo importante sia nei processi fisiologici che patologici, che vanno dallo sviluppo embrionale all'angiogenesi e alle metastasi tumorali. L'actina citoscheletrica è stata per lungo ritenuta semplicemente un'impalcatura statica per il mantenimento della forma delle cellule, della polarità e del supporto meccanico, in realtà questa subisce un rimodellamento dinamico che coinvolge decine di proteine che regolano il citoscheletro. L'idrolisi dell'ATP dalla forma filamentosa dell'actina (ATP-F actina) è uno dei principali fattori che regolano la transizione tra la forma F e la G-actina. Lo stato dell'actina legata all'ATP è più stabile dello stato actina-ADP ed in vitro è stato visto che i filamenti si accrescono più velocemente all'estremità denominata barbed end

Pagina 13

(o polo positivo) del filamento, e dissociano meglio invece dall'estremità denominata pointed end (o polo negativo).

Questo processo dinamico di polimerizzazione/depimerizzazione dell'actina

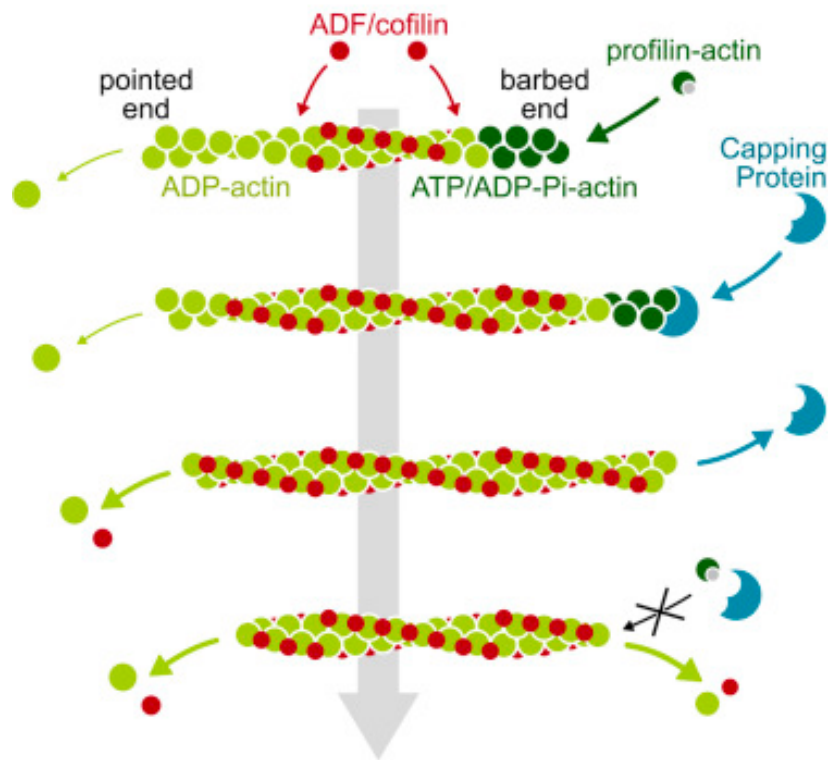


Fig.3 Treadmilling dell'actina [38]

viene chiamata sotto il nome di “treadmilling” [3].

Possiamo considerare la migrazione cellulare come un processo che avviene in quattro fasi. In primo luogo, una porzione della membrana cellulare deve protrudere verso l'esterno in direzione della migrazione per formare un lamellipodio in un processo noto come protrusione cellulare. In secondo

luogo, le aderenze focali devono essere effettuate sul bordo anteriore della cellula migrante (cioè, al lamellipodio) per creare le connessioni necessarie alla migrazione tra il citoscheletro cellulare e la matrice extracellulare. In terzo luogo, le proteine, quali miosina, devono attivarsi per provocare una contrazione attiva. In quarto luogo, quando si verifica la contrazione, le aderenze sul bordo “posteriore” della cellula devono dissiparsi per consentire l’avanzamento della cellula in direzione del lamellipodio. Ognuno di questi passaggi comporta un complesso gioco di interazioni cellulari tra la matrice extracellulare della cellula e il citoscheletro, mediato da proteine di adesione cellulare come le integrine. Il citoscheletro può quindi essere considerato come un collegamento critico tra l’ambiente esterno che circonda una cellula e le vie di segnalazione interne alle cellule che alla fine convergono nel nucleo per effettuare il controllo sulla espressione genica [33].

Il monomero dell’actina è composto da due strutture α/β (o domini) di dimensioni diverse che rappresentano il “fold” ATPasi”. Tra i due domini si osservano piccoli contatti che permettono l’assemblaggio dei due solchi. Il solco superiore è in grado di legare ATP o ADP e cationi Mg^{2+} bivalenti che forniscono un’ulteriore interazione tra i due domini. Il solco inferiore è invece composto da diversi residui idrofobici essenziali per i contatti tra le subunità di actina all’interno del filamento e per la maggior parte delle ABP. L’actina

monomerica è un'ATPasi inefficiente, ma la sua attività è potenziata una volta che viene incorporata nei filamenti. L'alta concentrazione di ATP nelle cellule, e l'affinità dell'actina per questa piuttosto che per l'ADP, connessa alla lenta attività ATPasica del monomero, portano ad una maggiore concentrazione complessiva di G-actina associata all'ATP.

2.1 Actin binding protein (ABP)

Le celle sono dotate di diverse ABP, (più di 60 classi), note per regolare diversi aspetti della polimerizzazione dell'actina. Nella sezione successiva sono prese in considerazione alcune di queste, quali: profilina, ADF/cofilina e CAP1. Il tasso di allungamento del filamento dell'actina è proporzionale alla concentrazione delle singole subunità di questa. I tassi massimi di protrusione cellulare richiedono una concentrazione di subunità pronte alla polimerizzazione di almeno cento volte la concentrazione necessaria nello stato a riposo. È noto anche che le cellule mantengono un pool di subunità di riserva nel caso in cui sia necessaria una protrusione esplosiva o non stazionaria, tanto che le proteine leganti i monomeri di actina cooperano per mantenere il pool di actina non polimerizzata [4].

2.1.1 La profilina:

È una piccola proteina (14–19 kDa), che è in grado di associarsi all'estremità barbed end del singolo monomero (G-actina-ATP) in modo da promuovere l'allungamento del filamento dall'estremità positiva bloccando, al contempo, il legame al point end del filamento [4]. Pertanto la profilina (insieme alla β -timosina 4 o T β 4) contribuisce a mantenere una grande frazione (circa il 50%) dell'actina cellulare nel pool non polimerizzato, ad una concentrazione (~20--100 μ M) che è dalle 200 alle 1000 volte superiore alla concentrazione critica per la polimerizzazione delle estremità barbed end (~0,1 μ M). Le proprietà multiple permettono alla profilina di svolgere un ruolo centrale nell'assemblaggio dei filamenti:

- a) La profilina catalizza lo scambio di ADP con ATP sull'actina, che riempie il pool di monomeri di ATP-actina pronti per la polimerizzazione
- (b) Inibisce la nucleazione dei filamenti, il che spiega in parte la necessità di nucleatori dei filamenti
- (c) I monomeri di actina legati alla profilina non possono aggiungersi alle estremità pointed end, ma possono allungare le estremità positive dei filamenti

d) A causa della sua maggiore affinità con l'actina, la profilina è in competizione con la T β 4 per il legame con questa. Questo permette alla profilina di mantenere un pool di actina pronta all'allungamento del filamento, mentre la T β 4 lega i monomeri in riserva.

e) La profilina compete con i fattori l'ADF/cofilina per il legame alla ADP-actina e promuove la dissociazione dell'ADP a causa della maggiore concentrazione di ATP nelle cellule viventi e della sua maggiore affinità per l'actina-ATP rispetto all'ADP [4].

2.1.2 ADF/Cofilina:

L'ADF/cofilina è una famiglia di proteine leganti l'actina responsabili della depolimerizzazione dei filamenti. Sono espresse in tutti gli eucarioti, e per quanto riguarda i mammiferi, sono codificate da tre geni altamente conservati (70%-82%):

- CFL1, che codifica per il cofilina 1 (non muscolare, o n-cofilina) è la principale isoforma nei neuroni dei mammiferi.
- CFL2, codifica per il cofilina 2 (si trova nel muscolo o m-cofilina)
- DSTN, codifica per la destrina, nota anche come fattore depolimerizzante l'actina (o ADF)

A livello neuronale nei mammiferi la cofilina è presente in una concentrazione dalle 5 alle 10 volte in concentrazione maggiore rispetto alla ADF [6]. La cofilina ha quattro cisteine che possono subire l'ossidazione per formare specifici legami di disolfuro intramolecolari o intermolecolari. L'ADF ha sette residui di Cys ma solo tre (C39, C80 e C147) sono conservati insieme a quelli della cofilina. È stato dimostrato che l'ADF è una proteina in grado di depolimerizzare l'actina in modo più efficiente della cofilina perché ha una capacità di nucleazione più debole e quindi una maggiore capacità di sequestro del monomero. Inoltre, i topi privi di cofilina non sopravvivono e vanno incontro a morte embrionale mentre, i topi KO di ADF sono vitali ed hanno riscontrato che la loro anomalia più significativa è l'ispessimento della cornea che porta alla cecità già dalle 4 settimane di sviluppo postnatale [5]

Hanno visto inoltre che la cofilina ha una affinità prevalente per le subunità ADP-actina in un filamento rispetto alle subunità dell'actina-ATP e ADP-Pi-actina. Un partner essenziale della dinamica dell'actina, è una proteina associata alle ciclasti (CAP) che migliora l'attività di taglio del filamento da parte della cofilina e il conseguente rilascio del monomero [6].

3. Proteina associata alle ciclasasi (CAP)

La proteina associata alle ciclasasi o CAP (ID proteina: Q01518) è una proteina multidominio unica che è stata identificata per la prima volta nel 1990 come componente del complesso di adenilato ciclasasi CYR1P del lievito *Saccharomyces cerevisiae* [15]. La proteina CAP partecipa all'attivazione dell'adenilato ciclasasi mediato dalle proteine del sarcoma di ratto (Ras) ed è stato quindi chiamato *S. cerevisiae* cyclase associated protein (Srv2/CAP). Questa interazione si verifica grazie all'interazione tra l'N-terminale di CAP e l'enzima [15]. Nel topo, tale proteina è stata parzialmente caratterizzata e si è visto essere identica per un 95% con la variante umana. Negli eucarioti superiori, compresi i mammiferi, c'è una mancanza di prove solide a sostegno di una conservazione di questa interazione CAP/adenilato ciclasasi; infatti, la struttura dell'enzima non è stata conservata durante l'evoluzione, e il dominio N-terminale della proteina CAP che media l'interazione con l'adenilciclasasi ha la sequenza amminoacidica variabile. Ulteriori studi rivelano che entrambi gli omologhi di CAP del lievito sono proteine bifunzionali, dove l'N-terminale media la segnalazione RAS/cAMP, mentre l'estremità C-terminale si lega e sequestra l'actina monomeric (G-actina) per regolare il citoscheletro [9]. In seguito, è stato dimostrato che la proteina CAP funziona come componente del complesso dell'adenilato ciclasasi solo nel lievito, e che la sua funzione

principale è quella di rimodellare il citoscheletro dell'actina. Così, nel 1996, una proteina omologa a CAP è stata isolata dall'ameba *Dictyostelium discoideum* e caratterizzata come proteina legante dell'actina

3.1 Generalità

A seconda della specie, la proteina CAP è composta da 450-550 amminoacidi, e ha diversi domini distinti. Nei mammiferi sono state identificate due isoforme della proteina CAP: CAP1 e CAP2. La prima è espressa praticamente in tutti i tessuti e cellule, mentre CAP2 è più specifica e si ritrova principalmente nelle cellule del muscolo scheletrico, cardiaco, nell'encefalo e nell'epidermide [15,25].

Studi condotti da Chua et al., (2003) hanno evidenziato che il trasferimento della cofilina nei mitocondri in certe condizioni promuove l'apoptosi [16,24] e vista l'interazione cofilina-CAP nella dinamica del citoscheletro, questo ha suggerito un potenziale ruolo anche di quest'ultima come fattore pro apoptotico, tanto che nel trattamento di varie linee cellulari con un agente in grado di indurre apoptosi (staurosporina), è stata osservata la traslocazione di CAP1 nei mitocondri; confermando poi in vitro la resistenza delle cellule

deplete di CAP1 all'apoptosi [15]. Rimane però da chiarire quali siano i meccanismi molecolari alla base [20,26]. È interessante notare che CAP 1 è stata identificata come autoantigene in pazienti con lupus eritematoso sistemico [25] e artrite reumatoide [26], suggerendo che CAP 1 potrebbe avere sia una funzione extracellulare che intracellulare. Entrambe le isoforme umane di CAP sono recentemente emerse come marcatori di tumori invasivi: CAP 1 sembra implicata nei tumori della mammella, del polmone, del pancreas e delle ovaie insieme ai gliomi, ai carcinomi epatocellulari e ai carcinomi squamosi della testa e del collo, mentre l'isoforma CAP 2 è overespressa nel carcinoma epatocellulare, nel melanoma maligno, nel tumore della mammella e nel tumore gastrico e la sua espressione è associata a scarsi risultati clinici. CAP2 è anche sovrapprodotta nei tumori della vescica, del colon, dei reni e della tiroide [41], il che la rende un marker comune. Tuttavia, il ruolo esatto del CAP nella tumorigenesi è ambiguo, ed è stata proposta anche un'azione anti-oncogenica di tali isoforme. È interessante notare che le mutazioni legate al cancro su CAP 1 e 2 sono soprattutto nel dominio N-terminale, con mutazioni nella isoforma 1 al livello del residuo Arg-29, che però non è conservato tra le due isoforme [22].

3.2 Struttura:

L'isoforma CAP 1 (51,9 kDa) è codificata da un gene localizzato nel cromosoma 1, locus 1p34.2 (ID del gene: HGNC: 20040); è costituita da 475 residui di aminoacidi, ha struttura perlopiù esamerica e comprende sei domini. Le due isoforme umane della proteina associata alla ciclasi (CAP1 e CAP2) condividono tra loro il 64/75% di identità della sequenza (Figura 1b) e ~35%/50% di identità con il lievito Srv2 [22].

Nelle cellule di mammifero, la struttura CAP 1 è stata studiata con metodi di microscopia elettronica dissipativa e ricostruzione tridimensionale, rivelando la formazione da parte di CAP1 di un complesso esamerico simmetrico [15].

Partendo dall'estremità N-terminale troviamo (Fig.4):

- Coiled coil: è una regione di circa 40 aminoacidi che nel complesso Srv/CAP del lievito è sufficiente per creare un legame con l'enzima adenilato ciclasi. Nelle cellule dei mammiferi lega la cofilina, promuovendo così la depolimerizzazione dell'actina.
- HFD (high folded domain): le analisi strutturali mostrano che l'HFD forma un dimero antiparallelo associato lateralmente. Inoltre, è in grado di determinare il legame al complesso ADF/cofilina-G-actina e interagisce

anche con i filamenti di actina legati all'ADF/cofilina per promuoverne il taglio

- [20]. Questo, all’N-terminale, è necessario per l'oligomerizzazione di CAP, inoltre questa auto-oligomerizzazione di CAP rafforza l'attività funzionale della proteina e quindi di modellatore dei filamenti di actina [39].
- P1: è un tratto ricco di proline (circa 10) altamente conservato in diverse specie che permette l’interazione con varie proteine, tra cui la profilina
- WASP dominio omologo 2: è detto anche Wiscott Aldrich Syndrome protein homology 2 e nel lievito media il legame alla G-actina e ha un ruolo cruciale nello scambio nucleotidico dell'actina G (come riportato in Fig.5). Il dominio WH2 è uno dei più diffusi tra le proteine leganti l’actina, risulta quindi essere essenziale per processi come: la contrazione cellulare, la motilità e le vie di segnalazione [39].
- P2: tratto ricco di proline meno conservato rispetto al P1
- CARP: è un dominio ricco di foglietti beta, che si lega al monomero di actina ed è essenziale per migliorare lo scambio ATP-> ADP sull’actina [40]
- Dominio di dimerizzazione

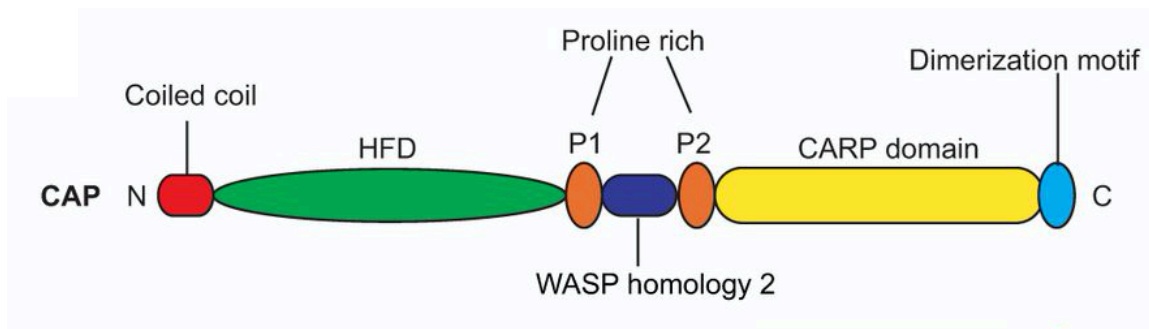


Fig.4 struttura CAP1

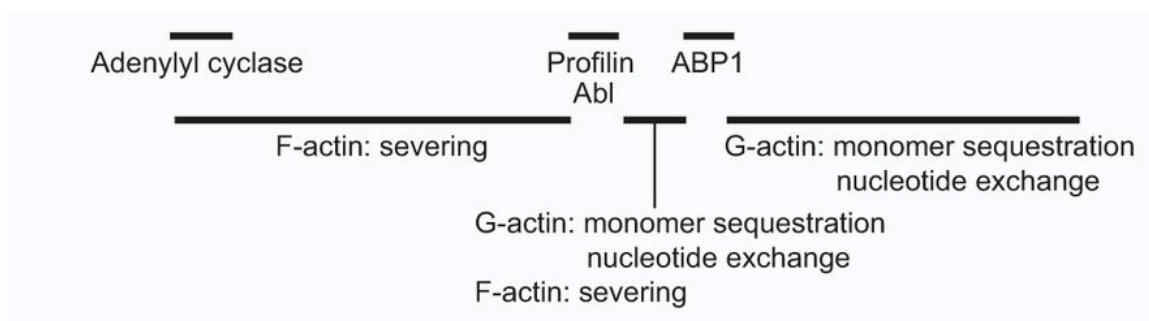


Fig.5 schema di relazione-funzione dei domini di CAP

S Jansen e collaboratori (2014) hanno scoperto che CAP1 può legarsi indipendentemente con alta affinità ai monomeri di actina per mezzo della sua estremità C-terminale e del dominio WH2; inoltre, il C-terminale di CAP1 può sia dissociare il complesso ADP-G-actina, che legarsi alla forma globulare dell'actina indipendentemente dal dominio WH2; infatti hanno rilevato che l'estremità C-terminale si lega all'ADP-G-actina con alta affinità (Kd 20 nM) e all'ATP-G-actina con un'affinità 100 volte inferiore (Kd 2 μ M) [21]. Quindi, questi due meccanismi possono da un lato permettere alla

proteina CAP1 di accelerare il rimodellamento dei filamenti di actina nella cellula, e dall'altro determinare la formazione di strutture arricchite di actina come filopodi e lamellipodi necessari per la migrazione cellulare [15].

3.3 L'attività:

Sebbene la proteina CAP sia stata originariamente scoperta come componente del percorso di segnalazione Ras-cAMP, gli studi in varie specie suggeriscono che questa funzione di segnalazione è specifica solo per un numero limitato di organismi, però studi genetici hanno fornito prove solide che la proteina CAP come rimodellatore citoscheletrico è conservata tra gli organismi. Durante il ciclo di “treadmilling” dell’actina, la costante ricarica sulla G-actina con l'ATP e l'idrolisi di questa sulla F-actina, determina la depolimerizzazione parziale dell'ADP-G-actina dall'estremità pointed end dal filamento e la polimerizzazione dell'ATP-G-actina dall'estremità barbed end [Fig.6]. Sebbene il dominio CARP sia sufficiente a promuovere lo scambio nucleotidico di ADP-G-actina, WH2 è necessario per facilitare lo scambio nucleotidico quando ADF/cofilina è legata ad ADP-G-actina, infatti poiché ADF/cofilina e WH2 condividono lo stesso sito di legame su G-actina, il dominio WH2 di CAP potrebbe essere necessario affinché possa competere con ADF/cofilina per il legame alla G-actina; tuttavia, la base

strutturale per l'accelerazione dello scambio nucleotidico sulla forma globulare dell'actina da parte di CAP è in gran parte sconosciuta[21].

CAP promuove anche la separazione dei filamenti di actina legati all'ADF/cofilina; (queste attività sono simili a quelle esercitate dalla profilina) l'ADF/cofilina si lega in modo cooperativo ai filamenti di actina e CAP è in grado di promuovere la separazione di questi nell'interfaccia del filamento tra la parte “ decorata “ e quella nuda del filamento [41].

3.3.1 CAP agisce come monomero?

Studi strutturali condotti su lisati di cellule HEK293 hanno evidenziato che il peso molecolare del complesso CAP1-actina è di 549 kDa. Poiché il CAP si lega ai monomeri di actina con una stechiometria 1:1, questo dato suggerisce che CAP1 agisce come un complesso esamerico ovvero composto da 6 molecole di CAP1 (51,9 kDa) e 6 molecole di actina (41,7 kDa), simile al complesso Srv2-actina del lievito [21]. La sostituzione del dominio di oligomerizzazione della proteina CAP ha messo in luce come la oligomerizzazione di tale proteina sia funzione della sua efficienza ovvero , che la sua attività è direttamente proporzionale alla stechiometria della loro associazione; cioè, tetrametri e trimeri sono più potenti dei dimeri, che sono più efficaci dei monomeri [22].

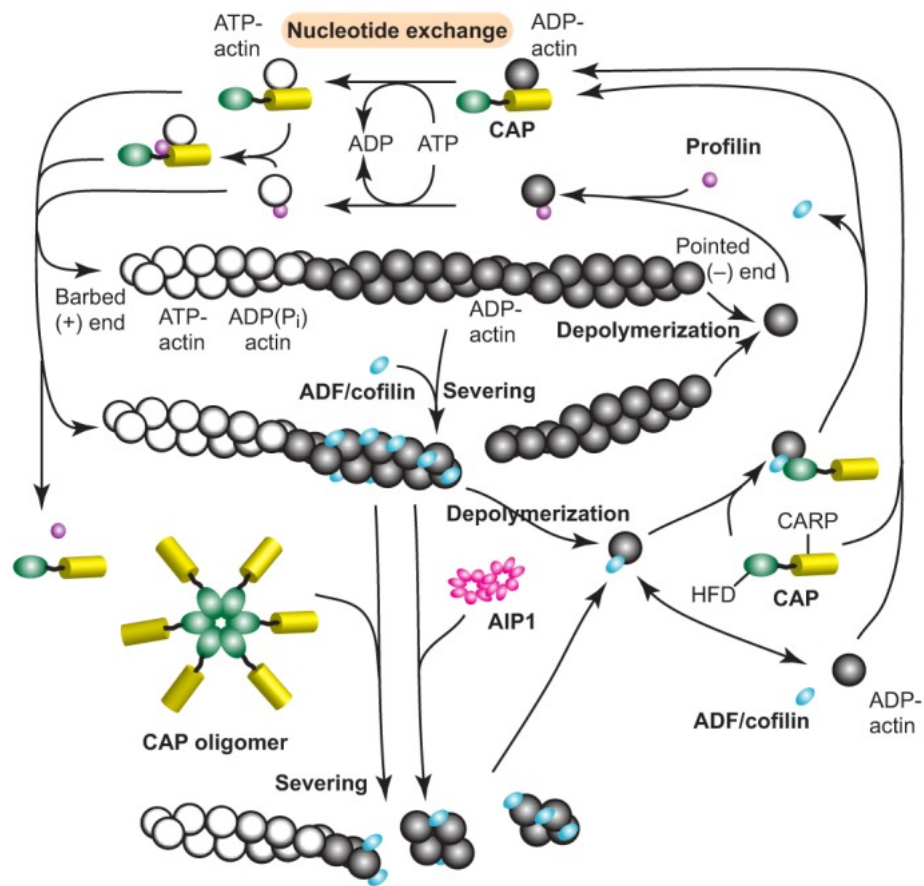


Fig. 6. Regolazione della dinamica dei filamenti di actina da parte di CAP, ADF/cofilina, profilina. L'organizzazione molecolare dell'oligomero CAP è ipotetica. Si noti anche che CAP si lega ai monomeri dell'actina in forma oligomerica ma, per semplicità, solo un CAP monomero viene mostrato come forma legata alla G-actina.

L'oligomerizzazione è funzionalmente importante, e l'N-terminale ad α -elica è ritenuta critica per la formazione degli esameri, in quanto la sua rimozione ha ridotto la capacità del dominio HFD di potenziare la separazione e la

depolimerizzazione del filamento. Ad oggi però la struttura dell'oligomerizzazione Srv2/CAP non è chiara.

Il CAP può anche dimerizzare o oligomerizzare in assenza dell'actina, e sono note tre le regioni necessarie per mediare questa auto-associazione: la regione N-terminale coiled coil, il dominio l'HFD ed il motivo di dimerizzazione al C-terminale [20].

3.3.2 Meccanismo molecolare

Riassumendo gli step di turnover dell'actina e alcune delle proteine coinvolte:

1. I monomeri ADP-actinici legati alla cofilina si dissociano dall'estremità negativa del filamento
2. I complessi cofilina-ADP-G-actina interagiscono con l'N-terminale di CAP perché non è in competizione con la cofilina per il legame alla G-actina. È stato inoltre visto che CAP lavora in sinergia con la cofilina per accelerare la depolimerizzazione dei filamenti di quasi 100 volte [27].
3. La cofilina si dissocia dall'ADP-G-actina (Kd 100 nM), così da permettere al dominio C-ter di CAP di legare l'ADP-G-actina per il quale mostra una alta affinità (Kd 20 nM). Inoltre, la cofilina libera non ha

alcuna affinità rilevabile per N-ter di CAP, quindi si dissocia liberamente dal complesso.

4. La cofilina libera interagisce con l'actina-ADP dei filamenti per promuovere un'ulteriore separazione e depolimerizzazione di questo.
5. Il legame del C-Srv2 con l'ADP-G-actina induce un rapido scambio di nucleotide (ATP per ADP). Questo passaggio può essere facilitato anche dalla profilina, che si lega al primo motivo ricco di prolina. Resta però determinare se il legame della profilina accelera lo scambio di nucleotidi catalizzati C-ter di CAP sui monomeri di actina e/o catalizzano la dissociazione dell'ATP-G-actina da C-ter.
6. L'ATP-G-actina dissocia da C-ter di CAP1, come risultato della ridotta affinità di legame di 100 volte di questo per l'actina nello stato legato all'ATP (K_d 2 μ M), e si associa così alla profilina per poi essere incluso nella estremità plus del filamento.
7. La Profilina ha una forte preferenza di legame per l'ATP-G-actina rispetto all'ADP-G-actina, e come tale non compete efficacemente con la cofilina per il legame dell'ADP-G-actina [21].

In base a studi cristallografici e di dinamica molecolare condotti di Kotila e collaboratori (2018), è stato proposto il meccanismo molecolare alla base dell'attività di CAP ovvero del suo ruolo nella dinamica dell'actina [27].

Come mostrato in Fig.7 il dimero del dominio CARP (giallo/arancione) è collegato tramite un linker ai domini HFD (magenta) di CAP. I filamenti ADP-actin (blu/verde) sono separati dalla cofilina(ciano). Il CAP si lega con alta affinità all'estremità pointed end del filamento ricoperto con la cofilina attraverso i suoi due domini HFD, e destabilizza l'interfaccia tra le due subunità terminali del filamento di actina.

Infatti, il dominio HFD interagisce con il complesso cofilina/actina con una maggiore affinità rispetto all'actina "nuda" e studi strutturali hanno evidenziato che l'actina ha una conformazione più contorta quando questa è associata in complessi ADF/G-actina e nei complessi ADF/G-actina /HFD rispetto alla struttura ADP-G-actina. Questo fornisce una spiegazione plausibile per il binding preferenziale del dominio HFD per l'actina quando questa è complessata con la cofilina. Inoltre, gli stessi autori hanno notato che il dominio HFD dimerico è stato in grado di accelerare fortemente la depolimerizzazione dei filamenti di actina a una concentrazione molto più bassa rispetto al dominio monomero HFD.

L'ultimo monomero di ADP-actina si dissocia dall'estremità minus del filamento, a causa dei vincoli spaziali e della perdita di contatti con il penultimo monomero del filamento. Il dominio HFD e la cofilina rimangono associati al monomero di actina. Il monomero di actina appena depolimerizzato passa dal dominio HFD al dominio CARP di CAP, mentre il secondo dominio HFD rimane legato all'estremità pointed end del filamento.

A questo punto, il dominio WH2 del CAP avvolge il monomero di actina, e insieme al dominio CARP adiacente sposta il dominio HFD (che hanno legato l'actina su due superfici non sovrapposte) e la cofilina dal monomero di actina; permettendo una consegna efficiente del monomero di actina appena depolimerizzato dalla metà del N-ter alla metà del C-terminale di CAP, che promuove lo scambio di nucleotidi ADP\ATP sull'actina. Successivamente quindi si catalizza lo scambio nucleotidico ADP-ATP sull'actina. Infine, il monomero ATP-actina viene rilasciato dalla metà C-terminale del CAP, e il dominio HFD libero si lega alla penultima molecola di actina nel filamento per iniziare un nuovo ciclo di depolimerizzazione [27,42].

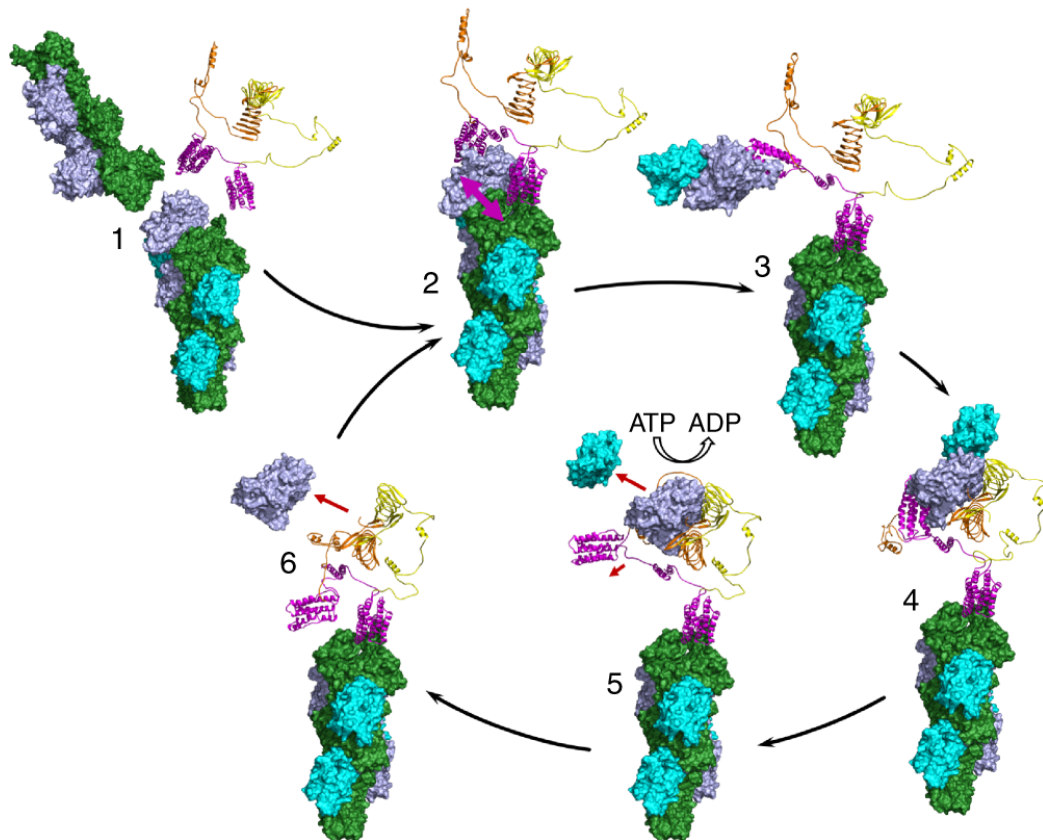


Fig.7: Un meccanismo modello per la depolimerizzazione dei filamenti di actina e il riciclaggio dei monomeri da parte di CAP. Per semplicità CAP è presentato come dimero.

Sulla base di questi dati, è stato proposto quindi un modello secondo il quale CAP funziona come una macchina molecolare che guida due fasi critiche del ciclo dei filamenti di actina: la depolimerizzazione dei filamenti e il successivo riciclaggio del monomero [27]

4 SRF: fattore di risposta sierica

Il fattore di risposta sierica (noto come, SRF), è un fattore di trascrizione che controlla molti geni, detti immediate-early genes la cui espressione è attivata da stimoli mitogenici come l'aggiunta di siero alle cellule in vitro. Il fattore SRF è stato inizialmente scoperto attraverso una serie di studi basati sull'espressione del gene *c-fos*. *C-fos* è un proto-oncogene, un omologo del gene dell'osteosarcoma murino FBJ murino *v-fos* [45]. Sotto la regolazione genica di questo fattore, sono stati poi scoperti vari geni, che codificano molecole di segnalazione, fattori di trascrizione e molti componenti citoscheletrici ma anche geni che codificano per strutture presenti del muscolo cardiaco, liscio e scheletrico. *c-fos* è sempre stato di grande interesse nel campo della trascrizione grazie alla sua rapida sintesi di RNA dopo l'esposizione a fattori di crescita e mitogeni. Studi incentrati sulla regione 5'-fiancheggiante al promotore del *c-fos*, hanno identificato un elemento cis, chiamato Siero di risposta (SRE) necessario per l'induzione del siero sulla trascrizione di tale gene. SRF e la sua sequenza consenso - SRE - sono state

Pagina 34

poi trovate associate a diversi altri geni dell'IE (geni precoci) e a geni specifici per il tessuto muscolare.

SRF risulta essere conservato ed è codificato da un singolo gene la cui espressione è controllata dallo stesso prodotto. SRF presenta il caratteristico dominio MADS proprio delle famiglie dei fattori di trascrizione ed è presente nella maggior parte, se non in tutte le specie del regno animale, vegetale e fungino [29]. Almeno una specie di protista (*Dictyostelium discoideum*) ospita un ortologo di SRF, ma non sono stati ancora definiti ortologhi SRF nel regno batterico

I geni target conosciuti sono caratterizzati dalla presenza di copie singole o multiple di una sequenza consenso (SRE) composta da 10 coppie di basi CC[A/T]2A[A/T]GG, altrimenti nota come CArG box [28], per cui ci sono 64 possibili CArG box di a cui la SRF può legarsi Il fattore SRF lega quindi questa sequenza core cge è comune a tutti i promotori dei geni controllati da SRF. Per definizione, gli elementi di risposta al siero contengono un elemento cis (chiamato sito ETS) che lega i membri della famiglia ELK noti cofattori di SRF. Per cui, gli elementi di risposta sierica e le CArG box sono spesso indicati come uno stesso elemento; tuttavia, non dovrebbero essere considerati sinonimi poiché i CArG box non sono sempre associate a siti ETS adiacenti [29]. La sequenza centrale ricca di A/T della CArG box, permette la

Pagina 35

formazione di un solco minore stretto nella regione di DNA e le basi GG laterali, favoriscono la flessione nel solco maggiore.

L'omodimero SRF quando a contatto con il DNA si organizza in una struttura su tre livelli, ciascuno strato interagisce con il complementare nel monomero accanto. Come mostrato in Figura 7.1 alla base della struttura SRF-DNA si trova un coiled coil antiparallelo, costituito da due α -eliche anfipatiche che interagiscono con il solco minore del DNA. Il secondo strato è costituito da 2 foglietti β antiparalleli per monomero. Infine, all'estremità C-ter è costituita da strutture ad α -elica e coiled coil irregolare. Il legame di SRF al DNA costringe quest'ultimo a piegarsi di 72° .

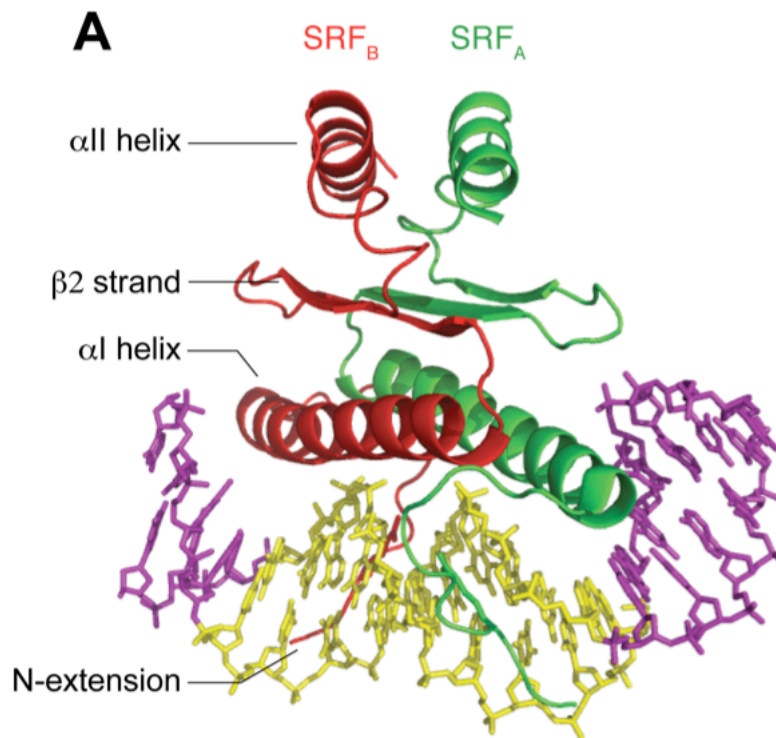


Fig 7.1: Cristallo dell'omodimero SRF, insieme alla sua sequenza target del DNA
Rappresentazione della struttura del dominio di legame sul DNA di SRF in combinazione
la sequenza consenso SRE. I due dimeri di SRF sono mostrati in rosso e verde. Il DNA è
rappresentato in viola con il SRE in giallo.

Nel sistema modello di fibroblasti, i geni attivati da SRF possono essere classificati in due tipi: quelli attivati dalla via del segnale Rho-actina che determinano fluttuazioni della actina monomerica influenzando sull'attività del cofattore MRTF; e quelli attivati dalla via del segnale Ras-ERK che controlla l'attività di TCF come mostrato in Fig.8 [36].

Per quanto riguarda la via del segnale Rho I Rho GTPasi sono piccole proteine G monomeriche appartenenti alla famiglia delle proteine G Ras. Comprendono 20 membri, tra cui i più studiati sono RhoA, Rac1 e CDC42. Queste GTPasi convertono la forma GTP (attive) a forme GDP inattive. La transizione tra attivo e inattivo è regolata da tre serie di proteine. I fattori di scambio nucleotidici della guanina (GEF) che promuovono il rilascio del GDP e l'associazione con il GTP, portando all'attivazione delle GTPasi Rho. Le proteine che attivano le GTPasi (GAP) ,potenziano l'attività catalitica di Rho, portando alla loro inattivazione. Infine, gli inibitori della dissociazione nucleotidica della guanina (GDI) mantengono Rho in uno stato inattivo inibendo lo scambio e impedendo la loro localizzazione alla membrana. Rho GTPasi regolano diverse proteine effettrici che controllano l'equilibrio di polimerizzazione di G-actina e F-actina nel citoplasma per cui i due cofattori attivati da due vie differenti, convergono sul nucleo per stimolare l'espressione genica SRF-dipendente [32].

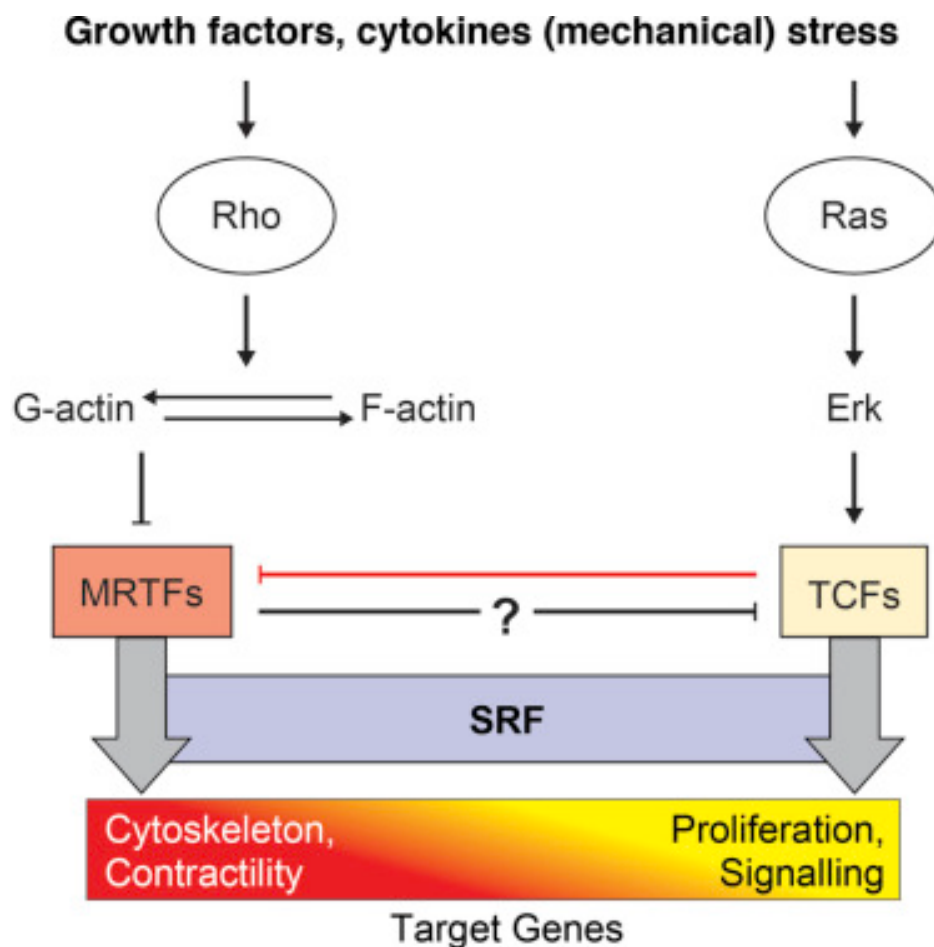


Fig. 8: SRF network.

Recenti studi genomici hanno identificato oltre 960 geni sotto il controllo del fattore SRF e la maggior parte di questi è risultata essere anche sotto il controllo del cofattore MRTF, e che codificano per proteine con funzioni legate alla dinamica dell'actina, alla formazione lamellipodi/filopodi, all'interazione integrina-citoscheletro, alla miofibrillogenesi e alla contrazione muscolare. SRF [34].

Una buona parte di questi geni è stata invece associata al controllo del cofattore TCF e implicati nella segnalazione, trascrizione e proliferazione cellulare [36]. È quindi emerso come un fattore di trascrizione indispensabile per la crescita cellulare, ma assolutamente essenziale per l'omeostasi contrattile di citoscheletro e actina [29].

Sono state caratterizzate due famiglie principali di cofattori che possono attivare il fattore SRF:

- TCF (fattore del complesso ternario) e più recentemente è stata caratterizzata una seconda famiglia di fattori,
- MRTF (fattore di trascrizione legato alla miocardite).

Per quanto riguarda quest'ultima famiglia, la miocardina, è il membro fondatore di questo gruppo di coattivatori, viene espressa sotto forma di due mRNA, che si traducono in una isoforma più lunga e una più corta, la prima presente nel tessuto muscolare cardiaco e l'altra in quello liscio, rispettivamente

Gli altri due membri della famiglia MRTF, MAL (chiamati anche MRTF-A, MKL1 o BSAC) e MRTF-B (chiamati anche MKL2 o MAL16), sono espressi ampiamente. L'attività di MAL e MRTF-B è regolata da un nuovo percorso di

segnalazione controllato da GTPasi della famiglia Rho e actina monomeric, mentre la miocardina stessa sembra attivare la SRF in modo costitutivo.

Anche se le MRTF sembrano contattare il DNA che affianca il sito di legame SRF, non sono state ancora identificate interazioni specifiche della sequenza

I Membri della famiglia TCF presentano un dominio proteico ETS (Elk1, Elk3 e Elk4) in grado di legare specifiche sequenze di DNA adiacenti ai CArG box di alcuni geni precoci (ad esempio c-fos) [32]. Studi funzionali suggeriscono che la presenza del motivo Ets è importante per il loro reclutamento, mentre molto meno si sa sugli effetti della sequenza di DNA sul reclutamento di MRTF. Dati recenti mostrano che le MRTF contattano il DNA direttamente, a condizione che il DNA sia opportunamente piegato o distorto dalla SRF, e che questo contatto del DNA è necessario per un'efficiente formazione del complesso SRF-MAL.

Così, come per i TCF, anche il reclutamento di MRTF potrebbe essere influenzato dalla sequenza del DNA. Anche se al momento sembra improbabile che l'interazione MRTF-DNA abbia una qualche specificità di sequenza diretta, rimane possibile che la sequenza di DNA del sito di legame SRF influenzi indirettamente il reclutamento di MRTF influenzando la sua capacità di piegarsi in modo appropriato nel complesso MRTF-SRF-DNA. È

necessario un ulteriore lavoro per valutare gli effetti della sequenza di DNA sul reclutamento MRTF. È stato riscontrato che la fosforilazione di queste proteine, in determinate condizioni, aumenta la formazione di un complesso ternario con SRF e DNA. Recenti studi hanno dimostrato che, poiché TCF e le proteine della famiglia MRTF competono per un sito di binding su SRF, esse interagiscono con questo in modo mutuamente esclusivo e attivano gruppi distinti di geni target [32].

4.1 SRF e neuroni

Come descritto in precedenza, SRF gioca un ruolo importante nell'influenzare la dinamica dei microfilamenti dell'actina. Di conseguenza, tutte le funzioni neuronali che si basano sulla motilità, sono state gravemente compromesse nei neuroni con il gene *Srf* mutato [30]. Infatti l'ablazione condizionale di SRF nei topi nel tardo-prenatale o nelle prime fasi post-natali ha portato a gravi fenotipi neurologici tra cui atassia, idrocefalo e perdita importante di peso corporeo. Per cui sul sistema nervoso, l'entità actina-MRTF-SRF governa molteplici aspetti della motilità neuronale [31].

4.2. MRTF: un co-fattore importante

La scoperta che l'attività di MRTF è sotto controllo diretto della Rho GTPasi e della dinamica dell'actina ha offerto la prima prova di un legame

precedentemente sconosciuto tra il citoscheletro dell'actina e l'espressione genica. Le proteine della famiglia MRTF sono codificate da geni situati su diversi loci cromosomici (miocardina umana 17p11.2, MRTFA: 22q13.2, MRTFB 16p13.12) ma condividono motivi strutturali comuni[32].

Il fattore SRF, interagisce con il suo co-fattore, MAL, un membro della famiglia dei fattori di trascrizione legati alla miocardina (MRTF), attraverso il suo dominio di legame con il DNA. Saggi funzionali e biochimici suggeriscono che le superfici di SRF legate dai fattori MRTF e TCF si sovrappongono ed inoltre questi risultati mostrano che MAL realizza contatti diretti con il DNA nel complesso MAL-SRF-DNA ma per far sì che si verifichi, è necessario che SRF sia legato al DNA [35].

È stata definita una sequenza di sette residui idrofobici all'interno della regione B1 che sono conservati e quindi essenziali per l'interazione specifica con SRF; inoltre la vicina sequenza Q-box facilita questa interazione, Fig 9. B3 e B2, sono necessari per l'importazione nucleare di MRTF

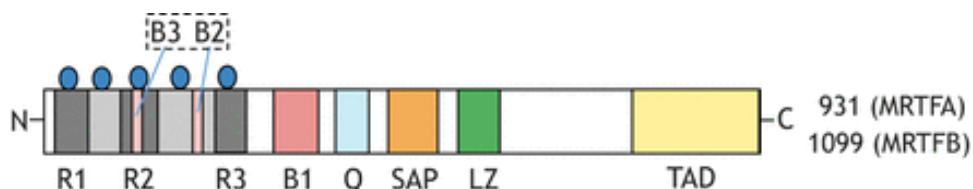


Fig. 9: domini MRTF

I tre motivi RPEL (RPEL1, RPEL2, RPEL3) all'N-terminale sono composti da una sequenza RPxxxEL e interagiscono con la G-actina; l'affinità per l'actina è più debole per il motivo R3[32]

Studi di cristallografia hanno rivelato che le due regioni spaziatrici (nella figura in grigio chiaro o S1 e S2) tra i domini RPEL contribuiscono anche al legame dell'actina, consentendo sia complessi trivalenti (actina che lega le regioni RPEL1, RPEL2 e S1) sia pentavalenti (due molecole di actina aggiuntive che legano anche le regioni S2 e RPEL3) tra l'actina (ovali blu) e il dominio RPEL per MRTFA.

La regione di base (B3 e B2) contiene un segnale di localizzazione nucleare (NLS); una seconda regione di base (B1) con un altro NLS e un sito di legame SRF; un dominio ricco di glutammina (Q) che promuove l'esportazione nucleare e regola il legame SRF; un motivo presunto di legame del DNA - il dominio SAP - che permette a MRTF di trascrivere i geni in modo indipendente dalla SRF; una cerniera leucina (LZ) che facilita l'omo e l'eterodimerizzazione della proteina; e il dominio di attivazione trascrizionale (TAD). È bene sottolineare che la miocardina ha motivi strutturali simili

Analisi di Foot printing hanno dimostrato che MRTF interagisce anche con le sequenze di DNA prossimale al CArG-box, e la curvatura assunta dal DNA previo legame di SRF, facilita l'associazione di MRTF [46].

Come detto in precedenza, il controllo dell'espressione genica guidata da MRTF-SRF è altamente sensibile alla concentrazione monomerica di actina nelle cellule e lo stato di polimerizzazione dell'actina nel nucleo ha anch'essa un ruolo sulla funzione MRTF. Il legame della G-actina non solo impedisce a MRTF di interagire con le importine nucleari, ma promuove anche la sua esportazione nucleare CRM1-dipendente. È bene precisare che recentemente hanno visto che la localizzazione subcellulare di MRTF può essere regolata anche in modo indipendente dall'actina, ad esempio attraverso lo stato di fosforilazione di MRTF.

In particolare, la fosforilazione del Serina 98 inibisce la formazione del complesso MRTF-A-actina, promuovendo così l'importazione nucleare di MRTFA ed al contrario, la fosforilazione della Serina 33 ne promuove l'esportazione nucleare. Il legame con l'actina nucleare, che porta all'esportazione nucleare di MRTF, è facilitato dalla fosforilazione mediata da MAPK su MRTF-A a livello della Ser454. La filamina (proteina legante l'actina), interagisce con MRTF-A, svolgendo un ruolo importante nella prevenzione della fosforilazione dell'MRTFA e, quindi, commuta l'MRTFA

Pagina 45

dallo stato di inattivo con la G-actina al suo stato attivato. Infine, la fosforilazione MRTFA da GSK3 β promuove la sua ubiquitinizzazione e la sua successiva degradazione, suggerendo quindi che i livelli cellulari di MRTF possono essere regolati anche dalla fosforilazione. In sintesi, la MRTF è regolata sia positivamente che negativamente dalla fosforilazione, a seconda del sito di fosforilazione (Fig 10) [32].

Nelle cellule non stimolate con siero, MRTF è prevalentemente localizzato nel citoplasma. [32]. Infatti, Nelle cellule a riposo, il monomero di actina sequestra MRTF-A nel citoplasma e impedisce la sua entrata nucleare. Al contrario, la stimolazione cellulare da parte, per esempio, componenti sierici attiva Rho-GTPasi, che a loro volta stimolano la polimerizzazione della F-actina nel citoplasma liberando così MRTF-A per l'ingresso nucleare, segue poi l'interazione SRF/MRTF-A e l'induzione trascrizionale dei geni codificanti per proteine citoscheletriche controllati da SRF. Questo importante meccanismo di regolazione, che collega la polimerizzazione dell'actina e l'espressione genica dipendente dalla SRF [30].

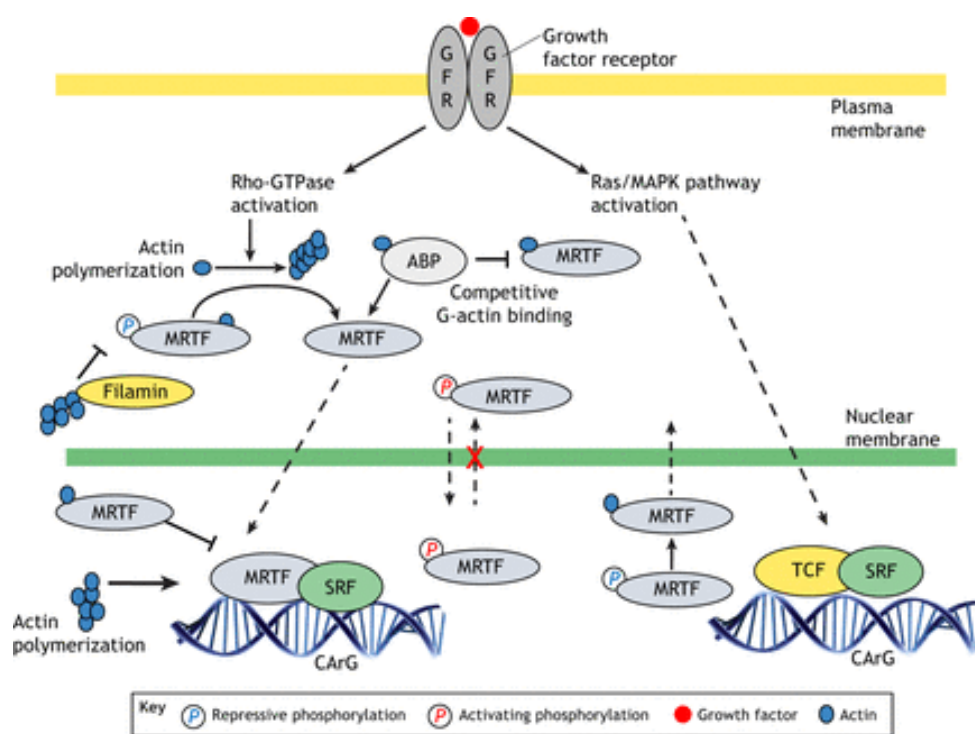


Fig.10: MRTF pathway

Come possiamo apprezzare dalla figura, il legame dei fattori di crescita ai recettori (GFR) attiva i percorsi di segnalazione Rho-GTPasi o Ras-MAPK, portando all'attivazione della SRF e alla sua successiva associazione con le famiglie di coattivatori MRTF o TCF. L'attivazione di Rho-GTPase avvia la polimerizzazione dell'actina e promuove la dissociazione di MRTF dall'actina monomeric (G-actina). Passando così dalla forma inattiva a quella attiva del cofattore; MRTF poi viene traslocato nel nucleo dove, insieme alla SRF, promuove l'espressione dei geni SRF-dipendenti. La dissociazione di MRTF

Pagina 47

da G-actina è anche facilitata dal sequestro dell'actina da parte di altre proteine leganti l'actina (ABP) tramite quindi una inibizione competitiva.

L'importazione e l'esportazione di MRTF dal nucleo cellulare sono regolati quindi da specifici stati di fosforilazione di MRTF da parte di enzimi chinasi.

È, tuttavia, il complesso pentamerico dell'actina-MRTF che è principalmente sensibile alle fluttuazioni della concentrazione di G-actina, incidendo così sulla localizzazione nucleare di MRTF.

In sintesi, la localizzazione nucleare di MRTF e l'attivazione dell'espressione genica MRTF-SRF sono regolate negativamente dalla disponibilità di G-actina ad interagire con le MRTF, che può essere influenzata sia da cambiamenti diretti alla polimerizzazione dell'actina che indirettamente attraverso altre proteine leganti l'actina.

Un recente studio ha ora identificato almeno 26 siti (Ser/Thr) di fosforilazione siero-indotti all'interno di MRTFA, molti dei quali bersagli di MAPK chinasi.

Le prove emergenti in letteratura suggeriscono che il ruolo di MRTF nella motilità cellulare si estende oltre la sua attività mediata dalla SRF. In primo luogo, MRTFA può promuovere la migrazione cellulare attraverso la cooperazione con altri fattori di trascrizione, oltre alla SRF, come esempio, con il fattore STAT3 e YAP aumentano la migrazione, l'invasione e il

Pagina 48

potenziale metastatico delle cellule tumorali del seno. In secondo luogo, l'MRTFA può anche attivare la trascrizione genica in modo indipendente da SRF utilizzando il suo dominio SAP; sono stati identificati ~200 geni la cui espressione dipende esclusivamente dal dominio SAP di MRTFA e non dipendono dalla capacità di MRTF di legarsi alla SRF [43].

Il dominio SAP è composto da 35 amminoacidi. Esso forma due eliche anfipatiche con una topologia simile a quella di diverse proteine leganti il DNA. Il dominio SAP è conservato in tutti i membri della famiglia MRTF. Ad oggi, non è stata osservata alcuna riduzione significativa dell'espressione genica e dell'associazione con geni target per le proteine MRTF prive di questo dominio [46].

MRTF-SRF è una via di segnalazione cruciale che collega l'organizzazione della dinamica dell'actina con il controllo trascrizionale di fattori in grado di influenzare la struttura citoscheletrica.

MATERIALI E METODI:

6. Metodi di coltura cellulare: linee murine e umane

Le linee cellulari usate sono state fornite dal Laboratorio Actin Dynamics Dipartimento di Farmacologia e Biochimica Facoltà di Medicina Prof. Marco Rust (Marburgo, Germania).

Nella tabella sottostante è riportata una breve descrizione:

Linee cellulari umane:	Linee cellulari murine
HEK (cellule embrionali umane da rene)	m-Hypo (cellule murine da ipotalamo)
HeLa (cellule umane da carcinoma della cervice uterina)	NIH 3T3 (fibroblasti murini)
	HT-22 (cellule murine da ippocampo)

Tabella 1: linee cellulari

6.1 linee cellulari

Le linee cellulari murine e umane, sono state mantenute in fiasca da 75 cm² con tappi filtranti (Gibco®) per una crescita in adesione. È stato utilizzato lo stesso protocollo, eccetto per il mezzo di coltura: DMEM (ThermoFisher)

Scientific, Gibco #11960-044) arricchito con FBS (Gibco, siero fetale bovino #10500064), sodio piruvato 100X (Gibco, 100mM #11360039), GlutaMax 100X (Gibco, 200mM #35050038) e penicillina/streptomicina 100X, è stato usato per le linee cellulari murine mentre il MEM (ThermoFisher Scientific, Gibco #12492013) con supplemento di L-glutammina per le linee cellulari umane.

7. Vettore pSUPER

7.1 pSUPER 3.1

Al fine di produrre costrutti che esprimevano gli small hairpin RNA (shRNA) d'interesse, è stato usato il vettore pSUPER.basic catalogo: VEC-PBS-0001/0002 ordinato alla ditta Thermofisher già linearizzato sui siti BgIII e HindIII . È un vettore di 3176 bp che provvede alla trascrizione diretta, in cellule di mammifero, di sistemi interferenti ad RNA (siRNA).

Il vettore, linearizzato, presentava le estremità defosforilate in modo tale da prevenire la circolarizzazione. È provvisto del gene per la resistenza alla ampicillina, come anche del promotore per la polimerasi-III H1, che è in grado di produrre trascritti da 19 nucleotidi a single strand tali da determinare il silenziamento dell'espressione genica del mRNA target attraverso l'appaiamento ed il conseguente taglio di questo (Fig. 11).

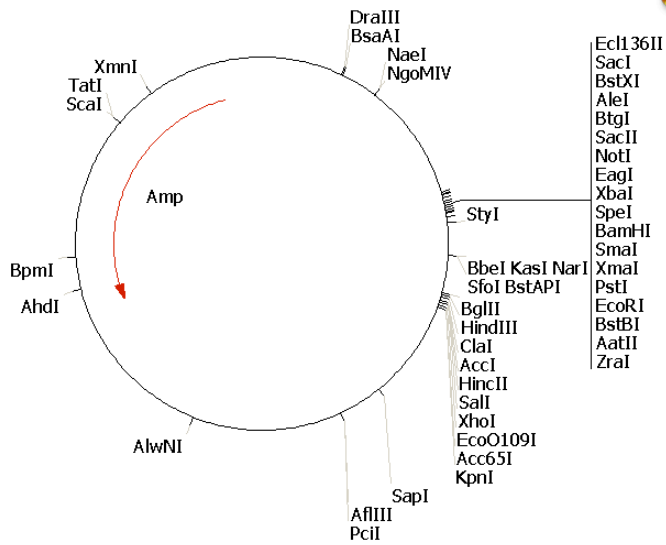


Fig. 11:pSUPER

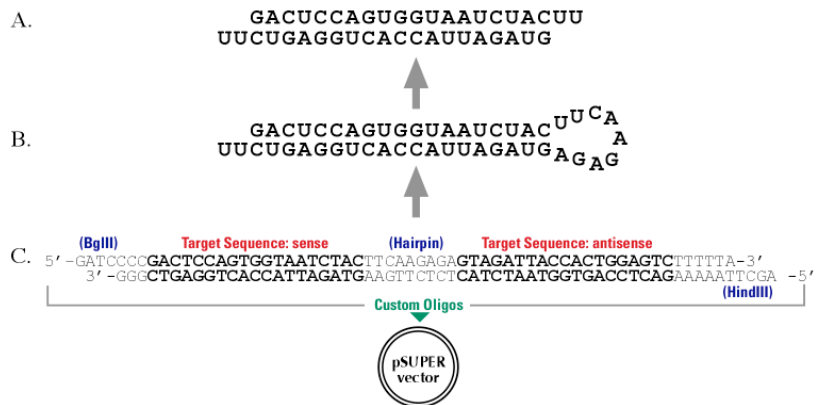


Fig.12: le sequenze degli shRNA, sono state clonate tra i siti di restrizione BglIII e HindIII. Il trascritto iniziale è composto da 60nt, verrà poi processato per generarne uno da 19nt.

7.2 Sequenze shRNA

Dalla letteratura sono stati scelti quattro differenti sequenze di shRNA da 19 pb, le quali sono state opportunamente allineate alla sequenza del gene CAP1 sia murino che umano utilizzando il software Seq Builder (DNA STAR, Madison, Wisconsin USA) ed è emerso che:

- shRNA-1: Sense: 5' AGATGTGGATAAGAAGCAT3', Antisense: 5' ATGCTTCTTATCCACATCT3' [16] è complementare sia con la sequenza CAP1 dell'uomo che del topo *Mus musculus*.
- shRNA-2: Sense: 5' CACGACATTGCAAATCAAG3', Antisense: 5' CTTGATTTGCAATGTCGTG 3' [16] è complementare solo nell'uomo.
- shRNA-3: Sense: 5' AGTTCAAGACCCTATGGAA 3', Antisense: 5' TTCCATAGGGTCTTGA ACT3' [48] è complementare solo nell'uomo.
- shRNA-4: Sense: 5' AAAGCATGGCAGCCATCTG 3', Antisense: 5' CAGATGGCTGCCATGCTTT 3' [47] è complementare sia con la sequenza CAP1 dell'uomo che del topo *Mus musculus*.

La scelta è ricaduta su queste sequenze per via dei risultati già ottenuti in questi articoli sia su cellule umane che murine.

Le singole sequenze nucleotidiche con estremità defosforilate, forward e reverse, sono state ordinate presso l'azienda Thermofisher.

7.3 Protocollo di clonaggio

Agli oligonucleotidi è stata aggiunta acqua sterile nuclease-free per ottenere una concentrazione finale ,sia dello strand senso che antisenso di 100 μ M quindi si è provveduto alla opportuna diluizione dello stock.

Successivamente sono stati messi in agitazione 1000 rpm a 25°C per circa 30 minuti e nel frattempo sono state preparate 8 eppendorf da 1,5 ml alle quali è stato aggiunto 48 μ l di annealing buffer 1x (100mM acetato di potassio, 30 mM HEPES, 1mM cloruro di magnesio (MgCl₂), pH= 7.4) più 1 μ l del oligonucleotide plus strand e 1 μ l del minus strand al fine di promuovere la formazione dei duplex per ogni shRNA. Le provette sono state poste nel bagnetto per 5 min a 95 °C e di seguito 1 ora a RT per promuovere l'annealing (2pmol di duplex/ μ l).

Previo spin dei duplex formati, ad ogni campione sono state aggiunte le seguenti componenti:

T4 polynucleotide kinase (Thermoscientific)	1µl
10x T4 PNK buffer A (thermoscientific)	1µl
1mM ATP	1µl
acqua MilliQ	5µl
Oligonucleotidi appaiati (2pmol/ul)	2µl

Tabella 2: mix di fosforilazione

Sono poi stati posti a 37 °C per 30 minuti e successivamente a 70°C per 10 minuti in modo da inattivare l'enzima T4 PNK, ed infine 1h a RT.

Lo step successivo è stato quello di promuovere la ligazione tra i duplex ottenuti ed il vettore linearizzato. Il rapporto empirico usato per la clonazione dell'inserto nel vettore è 3:1. Per calcolare tale rapporto si è utilizzato il software http://molbio.ru/scripts/01_07.html

Avendo 4 differenti shRNA, è stata preparata una master mix per 5 campioni al fine di ridurre l'errore sperimentale come segue:

Dd H2O	78 μ l
10X T4 DNA buffer di ligazione	10 μ l
Psuper (BglII+HindIII; 35 ng/ μ l;17,28 fmol/ μ l)	5 μ l
Duplex fosforilati (400fmol/ μ l)	/
T4 DNA ligasi	5 μ l

L'enzima T4 DNA ligasi va aggiunto come ultimo componente in modo tale che espliciti la sua attività quando tutte le componenti sono nel giusto rapporto molecolare; ed è necessario che rimanga sempre in ghiaccio l'enzima.

Nelle 4 eppendorf è stato aliquotato 19,6 μ l di questa mix e poi aggiunto 0,2 μ l della rispettiva coppia di duplex, ottenendo un volume finale di 20 μ l. I campioni sono stati lasciati 2 h a RT.

Le cellule batteriche *Escherichia coli* ceppo BL21 sono state fornite dal laboratorio Actin Dynamic, una aliquota da 200 μ l è stata scongelata e addizionata in rapporto 1:1 con il buffer KCM. La mix è stata divisa in 4 differenti nuove eppendorf, ed in ognuna è stato aggiunto 1 μ l del rispettivo pSUPER shRNA. I campioni sono stati lasciati in ghiaccio per ulteriori 5 minuti poi subito a 42°C per 45 secondi statico, per poi trasferirli di nuovo in ghiaccio per 5-10 minuti. Infine, su 4 differenti piastre di terreno solido agar LB (Luria-Bertani) con ampicillina 100 μ g/ml, è stato piastrato un volume pari a 100 μ l e lasciate in incubatore a 37°C per tutta la notte in modo tale da consentire la crescita solo delle colonie batteriche trasformate con il costrutto d'interesse.

In seguito della crescita O.N, è stato prelevato per ogni piastra ,6 differenti colonie utilizzando direttamente la P100 con il puntale e inoculati in 2,5 ml di terreno liquido LB+amp così da promuovere la crescita solo dei cloni che si suppone abbiano replicato il plasmide d'interesse. Tutte le eppendorf sono state messe in agitazione a 200 rpm 37°C over night.

Della crescita O.N, sono stati prelevati i batteri in un volume di 1,5 ml e posti in nuove eppendorf per procedere con l'estrazione del DNA su piccola scala. Bisogna fare attenzione che rimanga del materiale dalla crescita O.N, in

quanto nel caso di cloni positivi, si andrà ad usare quel campione per effettuare una Midiprep, infatti queste sono state messe in camera fredda 4°C.

Per l'estrazione del DNA: si è centrifugato per 5 minuti a 8000 rpm, eliminato il surnatante e al pellet sono stati aggiunti 250 µl di buffer P1 (Tris-HCl, EDTA-2H₂O, 100 ug/ml RNase A, pH 8.0, stoccato a 4 °C) , in questo step è necessario vortexare bene i campioni per promuovere la risospensione cellulare. Successivamente sono stati aggiunti 250 µl di buffer di lisi P2 (0,5M NaOH in 900 ml H₂O, 10% SDS, stoccato a RT) ed i campioni sono stati invertiti 4/5 volte fino a all'osservazione del viraggio nel colore blu della soluzione. Infine sono stati aggiunti 350 µl di buffer N3 (295 g KAcetate in 500 ml H₂O, acido acetico, pH5.5), e sono stati miscelati ulteriormente per inversione ottenendo una chiarificazione dei campioni. Si è proceduto centrifugando 10 min a 13 000 rpm RT, circa 800 µl del surnatante è stato aliquotato in nuove eppendorf ed in queste, si è aggiunto 0,7xvol di isopropanolo (560µl) e incubato 5 min a RT. I campioni sono stati sottoposti ad una ulteriore centrifugazione a 13.000 rpm per 15 min RT poi è stato rimosso il SN. ai pellet ottenuti, sono stati aliquotati 500 µl 70% EtOH, sono stati sottoposti a vortex e centrifugazione per 5 min a 13.000 rpm e rimosso il SN. Per promuovere l'evaporazione dell'etanolo, i tappi di tutte le eppendorf sono stati lasciati aperti sul bancone per circa 30 minuti. A questo punto, si è

proseguito con la dissoluzione del pellet in 40 μl di ddH₂O e posto i campioni nel termomixer per 10 minuti a RT.

Per lo screening dei cloni positivi, sono stati usati tre controlli: un campione nel quale era presente solo l'enzima HindIII, un altro solo con EcoRI e uno privo di enzimi. Per singolo campione da testare, è stata preparata una mix come segue:

10X Tango buffer	4 μl
H ₂ O	9,5 μl
Miniprep	/
EcoRI (10u/ μl)	0.5 μl
HindIII (10u/ μl)	1 μl

Per un volume finale, sempre per campione, di 15 μl sono stati aggiunti 5 μl di plasmide.

I campioni sono stati sottoposti a vortex, spinnati e lasciati 2 ore a 37 °C. Se è presente l'inserito di interesse, il sito BglIII viene distrutto ma non HindIII. Per verificare la presenza di plasmidi ricombinanti, è stata utilizzata l'elettroforesi

su gel di Agarosio 2% (150 V per circa 1 ora) contenente oò colorante bromuro d'etidio 6X. Una tecnica che mi permette di separare mediante l'applicazione di un campo elettrico, frammenti di DNA o RNA che migrano attraverso il gel ad una velocità inversamente proporzionale alle loro dimensioni.

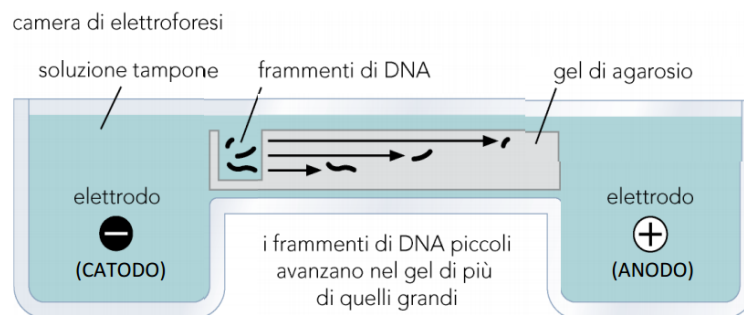


Fig.13: rappresentazione schematica di un'elektroforesi su gel di Agarosio

Tramite l'utilizzo del transilluminatore (PeqLab) sono stati analizzati i risultati della corsa elettroforetica ed i campioni positivi per il plasmide ricombinante sono stati preparati da per il sequenziamento. Il DNA è stato quantizzato con il Nanodrop, e i campioni sono stati inviati alla ditta Microsynth (Göttingen, Germania).

Il software Megaline (DNASTAR, Madison, Wisconsin USA) è stato utilizzato per l'analisi delle sequenze del plasmide ricombinante. È stato eseguito un allineamento multiplo utilizzando il tool ClustalW per analizzare i risultati del sequenziamento; che sono stati confrontati con il plasmide pSUPER vuoto, per accertarsi dell'avvenuto inserimento dell'inserito. I campioni con i plasmidi ricombinanti sono stati sottoposti ad una Midiprep .

7.4 Midi prep:

Per ottenere una quantità sufficiente di plasmidi da poter utilizzare per le prove di silenziamento in vitro, è stata effettuata una produzione in bulk utilizzando il Kit di estrazione MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.

Dai campioni che sono risultati positivi sono stati prelevati 100µl e i batteri quindi sono stati inoculati in nuove beute con all'interno 200 mL di terreno liquido LB+amp e messe in agitazione a 200rpm 37 °C O.N. I campioni sono stati sottoposti a 6.000 rpm per 15 minuti a 4°C, il surnatante è stato scartato prestando attenzione a non perdere il pellet al quale è stato aggiunto 8 mL di buffer RES per promuovere la risospensione cellulare mescolando up/down. Sono stati aggiunti 8mL di buffer LYS così da promuovere la lisi cellulare invertendo i campioni non più di 5 volte e sono state lasciate 5 minuti a RT. Successivamente sono stati aggiunti 8mL di buffer NEU. A questo punto,

come da protocollo, sono state preparate 4 differenti colonne da purificazione (una per ogni costrutto), sono state attivate usando 11 mL di buffer EQU. Dopo circa 10 minuti, su ogni colonna sono stati aggiunti 5 mL di buffer EQU per promuovere il passaggio sul filtro anche delle quantità di plasmide eventualmente ancorate alle pareti per poi procedere aggiungendo 8mL di WASH buffer. Per l'eluzione sono stati usati 5mL di ELU buffer; l'eluato è stato raccolto in nuove eppendorf da 14 mL alle quali sono stato i aggiunti 3,5 mL di isopropanolo, e vortexato per 2 min a RT. Per promuovere la precipitazione del DNA, i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione a 11,000 rpm per 30 minuti a 4°C , è stato rimosso il surnatante con la P1000. È necessario che tutto l'isopropanolo venga rimosso, e solo dopo, sono stati aggiunti 2mL di etanolo 70% al pellet e centrifugato per 10 minuti a 11,000rpm a 4°C. Infine l'etanolo è stato rimosso e per promuovere l'evaporazione persino delle ultime gocce, le eppendorf sono state capovolte sul bancone con il tappo aperto per 30 minuti. Sono stati aggiunti 300µl di acqua MilliQ e poi i campioni sono stati quantizzati al Nanodrop e aliquotati in 4 nuove eppendorf da 1,5mL e stoccati al -20°C.

8. Trasfezione cellulare:

Le linee cellulari sono state trasfettate, con lo scopo di testare l'effettiva down-regolazione della proteina CAP1, operata dai costrutti creati.

Dopo aver promosso la crescita cellulare in fiasche da 75 cm² si è provveduto alla loro conta utilizzando la Camera di Burker al microscopio ottico. Sono state ripartite in piastre 24 multi-well. Per le linee cellulari la densità usata è stata di 60.000 cell/well eccetto per la linea HEK (cellule embrionali umane renali) per le quali è stata utilizzata una densità di 150.000 cell/well per via del rate di crescita inferiore rispetto alle altre linee cellulari. Per ogni well il volume finale usato è stato di 500 µl.

Prima di procedere con la trasfezione le cellule devono: essere ben disposte su tutta la superficie senza la presenza quindi di agglomerati cellulari ed avere una confluenza pari al 60 % per ogni pozzetto. Le aliquote dei quattro plasmidi sono state scongelate a RT e per ogni condizione da saggiare, è stato utilizzato una quantità di plasmidi pari a 1000 ng/ pozzetto ripartiti come segue:

- 500 ng plasmide eGFP per stimare l'efficienza di trasfezione
- 300 ng del plasmide di interesse
- 200 ng PcDNA 3.1 necessario per avere la concentrazione di DNA ottimale.

I campioni usati come controllo, sono stati invece stati trasfettati con: 500 ng plasmide_eGFP, 200 ng PcDNA 3.1 e 300ng con il plasmide di controllo

negativo [19]. Una volta preparati i singoli campioni in eppendorf da 1,5mL sono stati mescolati con il medium DMEM (50 μ l /well) privo di siero per evitare che quest'ultimo interferisse con la formazione dei liposomi (DD-MIX). Alle cellule in piastra 24 multi-well è stato cambiato il mezzo di coltura 20 minuti prima della trasfezione; è stato usato DMEM privo di antibiotici e lasciate in incubatore CO₂ a 37°C per farlo equilibrare. Successivamente è stata preparata la LD-MIX, una soluzione composta da 1,25 μ l di lipofectamina 2000/well più 50 μ l/well di DMEM privo di siero e lasciata a RT per 5 minuti. È stata addizionata alla DD MIX in rapporto uguale e ogni campione è stato vortexato per 5 secondi e lasciato a RT per 20 minuti in modo tale da favorire la formazione liposomi. Infine, alle cellule sono stati aggiunti 100 μ l del corrispondente campione da saggiare, per poi posizionarle nuovamente in incubatore CO₂ a 37°C O.N. Per ogni condizione testata sono stati utilizzati due well.

L'utilizzo di un microscopio ottico supportato con lampada HBO filtro blu, ci ha permesso di eseguire una indagine qualitativa sull'efficenza di trasfezione andando quindi a visualizzare dopo 24 ore dalla trasfezione l'emissione di fluorescenza verde dalle cellule data dalla presenza del costrutto eGFP.

Se l'efficienza di trasfezione è intorno al 50%, si può procedere con la lisi cellulare. Il buffer di lisi usato era di produzione propria del laboratorio e tutta la procedura è stata condotta sul normale bancone di lavoro come segue:

- Le piastre cellulare sono sempre rimaste in ghiaccio ed il medium è stato rimosso grazie all'uso della pompa
- Sono stati aggiunti 500µl di PBS/well
- È stato rimosso il PBS e aggiunto 100 µl di buffer di lisi/pozzetto
- Le piastre sono state messe in agitazione 100 rpm a 4°C 10 minuti
- Le cellule sono state lisate anche grazie all'uso di una pipetta per effettuare un mescolamento up\down su ogni pozzetto per circa 10 volte
- Il lisato è stato trasferito in eppendorf da 1,5mL e lasciati in ghiaccio per 30 minuti
- Sono state centrifugate a velocità massima per 10 minuti a 4°C
- Il surnatante è stato trasferito in nuove eppendorf opportunamente siglate sempre in ghiaccio
- La concentrazione proteica è stata misurata con il kit BCA protein assay e
- i campioni sono stati stoccati al -80°C

9. Western Blot:

Per verificare che effettivamente i plasmidi ricombinanti esprimevano ed eventualmente andavano a promuovere il silenziamento dell'espressione genica di CAP1, ho allestito un saggio di WB.

Le concentrazioni dei lisati proteici da saggiare, sono state misurate utilizzando il kit BCA Protein Assay (ThermoFischer) per ogni linea cellulare e poi i campioni sono stati trattati con Laemmli Sample Buffer per promuoverne parzialmente una denaturazione proteica per poi completarla con un trattamento a 95°C per 5 minuti.

Componenti	Stacking gel 4%	Running gel 10%
H2O MilliQ	3,75 mL	7,5 mL
0,5 M Tris HCl pH 6.8	1,563 mL	\
1,5 M Tris HCl pH	\	4,69µl
Bis\Acrillamide	831 µl	6,25µl
APS	31,25 µl	33,75µl
TEMED	12,5µl	37,5µl

Tabella 4: componenti del Gel SDS-Page utilizzati

La corsa è avvenuta utilizzando il sistema Biorad per circa 1 ora e 30 minuti, dove i primi 30 minuti i campioni sono stati sottoposti ad un voltaggio pari a 80 Volt per proseguire poi con 120V. Finita la corsa, i gel sono stati usati per un trasferimento su membrana di nitrocellulosa con pori da 0,45 μm (Amersham Protran Premium) O.N in presenza di blotting buffer 10X(250mM Tris, 1,92M glicina) a 24 Volt in camera fredda. Le membrane sono state poi incubate con una soluzione di latte+TBS-t per 30 minuti e successivamente incubate per 2 ore con l'anticorpo primario contro uno specifico epitopo della proteina d'interesse e poi un ora con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi del rafano. Per la rilevazione del segnale sulla membrana è stato utilizzato il kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, in grado di fornire i substrati necessari alla perossidasi per generare un segnale chemiluminescente che poi è stato rilevato con l'apposito macchinario. Successivamente per valutare se il knock-down di CAP1 producesse una variazione sull'espressione genica mediata dal fattore SRF, si è performato un test con l'enzima luciferasi. Nello specifico le cellule murine sono state trasfettate con due vettori: il primo di controllo in grado di esprimere la luciferasi Renilla sotto il controllo di un promotore costitutivo, l'altro vettore invece produceva l'espressione dell'enzima Firefly posto sotto il controllo del promotore del gene c-fos modificato, nel quale erano presenti 3 siti di legame per il fattore SRF ma non per il co-attivatore TCF

promuovendo in questo modo una overespressione del gene a valle (ovvero della Firefly Luciferasi) mediata solo da SRF-MRTF (Fig.14).

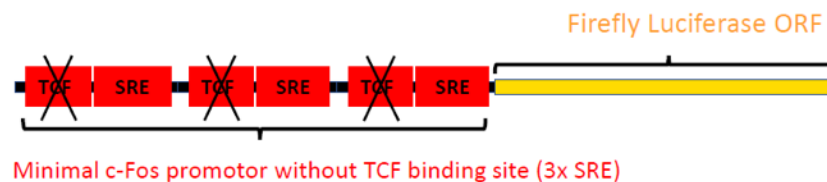


Fig.14: Promotore presente nel vettore FF, che esprime l'enzima Luciferasi Firefly

Il protocollo usato per questo proposito, risulta essere lo stesso usato per la trasfezione KD CAP1. Per pozzetto sono sempre stati usati 1000ng di plasmidi totali, ripartiti come segue: 50 ng plasmide Luciferasi, 50 ng plasmide Renilla, 300 ng pSUPER specifico, 600ng pcDNA 3.1 inoltre è stato usato anche un controllo composto da 50ng Luciferasi , 50 ng Renilla piu 9000ng pcDNA 3.1.

Passate le 35 ore di trattamento, le cellule sono state sottoposte a lisi.

- Le cellule sono state mantenute in ghiaccio e lavate due volte con 500 µl PBS mantenuto anch'esso in ghiaccio
- Sono stati aggiunti 100 µl/well di Passive lysis 1X buffer (Promega)

- Le piastre 24 multi-well sono state leggermente mosse, sigillate con parafilm e poste al -20°C fino al giorno della misurazione

Le cellule precedentemente lisate sono state messe a scongelare a RT nel mixer a 70 rpm per 30 minuti e successivamente sono stati aliquotati 20 µl dei lisati in una piastra a 96 well. Per poter misurare l'attività enzimatica di Renilla e Firefly sono state preparate due mix come segue:

1. FFb (50µl /well) : 500mM DDT, 10mM coenzimaA, 100mM ATP, 80mg/ml luciferina, buffer di lisi (no Triton).
2. RNb(75 µl /well): 10 mM PTC124 in DMSO, 2mM h-CTZ in etanolo, Renilla salts.

La prima ha tutti i reagenti necessari per stimolare l'attività della Firefly, mentre la seconda per la Renilla. Tutto questo avviene dentro al macchinario Glomax Luminometro in grado di registrare le emissioni di luminescenza. Anche in questo caso, il test con la luciferasi è stato inoltre eseguito in linee cellulari (HT-22 e m-Hypo) trattate con un cocktail di costrutti ovvero con shRNA_1 e 4.

10. Co-IP

Lo scopo è stato quello di indagare se CAP1 interagisse tramite contatti diretti con il co-fattore MRTF. Sono state utilizzate esclusivamente le cellule HT-22 per questo esperimento, sia per praticità sia perché è stata la linea cellulare che ha dato i risultati migliori nei precedenti test, quindi sono state splittate in piastre da 150mm ad una densità di 1.000.000 cell/piastra. Le beads che sono stati utilizzate sono di 3 tipologie al fine di validare quali fossero le migliori per la mia ricerca

- Dynabeads M-280 Sheep anti mouse IgG [10mg/mL] (Invitrogen). Queste vengono riconosciute da anticorpi di topo.
- Dynabeads protein A (Invitrogen), sono coniugate con un piccolo peptide in grado di legare anticorpi di coniglio.
- Dynabeads protein G [30mg/mL] (10004D, Invitrogen). Anche questo peptide può essere legato da anticorpi di coniglio.

Queste beads, sono state utilizzate prelevando dallo stock 50µl/ condizione

Buffer sterilizzati usati:

- Lysis buffer (IPLB): Tris HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM, Triton X-100 0,50%, una tavoletta di inibitore delle proteasi 25X (Roche), H2O MilliQ.
- Wash buffer (IPWB): Tris HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM, una tavoletta di inibitore delle proteasi 25X (Roche), H2O MilliQ.

- PBS 1X
- IPLB + inibitore fosfatasi (PhosSTOP™)

Le beads da testare sono state aliquotate in un volume pari a 110 µl. Sono state mescolate con 500 µl del buffer IPLB senza l'inibitore e poste 5 min in rotazione a RT per poi rimuovere la soluzione usando il DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen)

Lo step di lavaggio è stato ripetuto una seconda volta ma con 900 µl del buffer. Le beads sono state divise in nuove eppendorf (440 µl), e sono stati aggiunti ulteriori 300 µl di IPLB senza inibitore e mescolate per inversione.

Due metodiche sono state attuate in fase di preparazione delle beads da utilizzare:

- Per le Dynabeads M-280 Sheep ed Dynabeads protein A, i rispettivi anticorpi usati sono stati prima fatti reagire con le beads e una volta che queste si erano attivate, è stato aggiunto il lisato cellulare
- Per le Dynabeads protein G invece si è proceduto diversamente: gli anticorpi di Co-IP sono stati prima incubati con il lisato delle cellule HT-22, sottoposti a rotazione a 4°C 18 rpm per 1 ora e solo successivamente sono state aggiunte 50µl delle corrispondenti beads e messe in rotazione a 4°C per 1 ora.
-

Abbiamo usato 4 μ l di Ig 1 $^\circ$ α m-CAP1 ([5ng/mL] Novus, Polyclonal) per le Dynabeads M-280, mentre 10 μ l di Ig 1 $^\circ$ α Rb-CAP1 ([5ng/mL] Atlas antibodies) per le Dynabeads protein A e Dynabeads protein G.

Le piastre cellulari di HT-22 sono state mantenute sempre in ghiaccio e sono state sottoposte a lavaggio con 10 mL di PBS 1X. Sono poi stati aggiunti 5 mL di tale buffer per procedere con la raccolta delle cellule tramite spatola sterile. Le cellule raccolte sono state trasferite in una eppendorf e sottoposte a centrifugazione a 4 $^\circ$ C 800 rpm per 5 minuti.

Le cellule sono state risospese con 2,2 mL di IPLB + phosSTOP e sono state poi trasferire tutto nel omogenizzatore preventivamente lasciato in ghiaccio e sottoposte a rottura. Il lisato cellulare è stato centrifugarlo a 4 $^\circ$ C max speed per 10 minuti ed il surnatante è stato raccolto e aliquotato per un volume pari a 1 mL in quattro eppendorf da 1,5 mL opportunamente siglate e lasciate in ghiaccio.

NB: 200 μ l di surnatante puro è stato prelevato come INPUT.

Terminato il coupling degli anticorpi con le beads, sono state sottoposte a 3 lavaggi con IPLB 500 μ l:

1) Il primo lavaggio è avvenuto per inversione
Pagina 73

2) Il secondo ed il terzo, mettendo i campioni in rotazione per 5 minuti

Finito il terzo lavaggio, è stata rimossa la soluzione e aggiunto 50 µl di IPLB+ phosSTOP così da unirle al surnatante cellulare corrispondente. Il tutto è stato posto in rotazione per 2 ore velocità 17 rpm a 4 °C.

Terminate le due ore, i campioni sono stati sottoposti a 3 lavaggi con 1 mL di IPWB. Infine, per la eluzione è stato usato Loading Buffer 1X 65 µl/campione e stoccati O.N al -80°C.

Gli anticorpi usati per Wester Blot devono necessariamente appartenere ad una specie animale differente rispetto agli anticorpi utilizzati per la immunoprecipitazione per far sì che l'analisi in WB produca un segnale chiaro e distinguibile: a tal proposito nella sottostante ho riportato quelli che sono stati utilizzati per il WB

Dynabeads M-280	Dynabeads protein A/ Dynabeads protein G	
α Rb-CAP1(atlas Ab)	• α m-MRTF santa cruz biotechnology(mAB)	
α Rb cofilin (WILKE lab)	• α m actin G mAB	
α Rb pan actin (mAB , signaling technology)	• α mCAP1 (novus, Polyclonal)	
	• α m GADPH mAB	

11.Pull Down assay

Con lo scopo di isolare il complesso CAP-MRTF, abbiamo allestito un esperimento di Pull Down. In questo caso le beads di agar (o di altra natura), vengono accoppiate alle proteine di interesse, si aggiunge poi il lisato cellulare e tramite WB si analizza se la proteina di interesse ha funzionato come “amo” nella cattura di qualche altra proteina.

Per tale proposito, è stato utilizzato il Kit Pierce pull down poly His (Thermofischer):

step1:

Il sistema batterico utilizzato per la produzione della proteina di fusione CAP1-N-HIS tag è stato *Escherichia coli* ceppo Rosetta trasformato con il vettore pET-28a (Fig 15a)

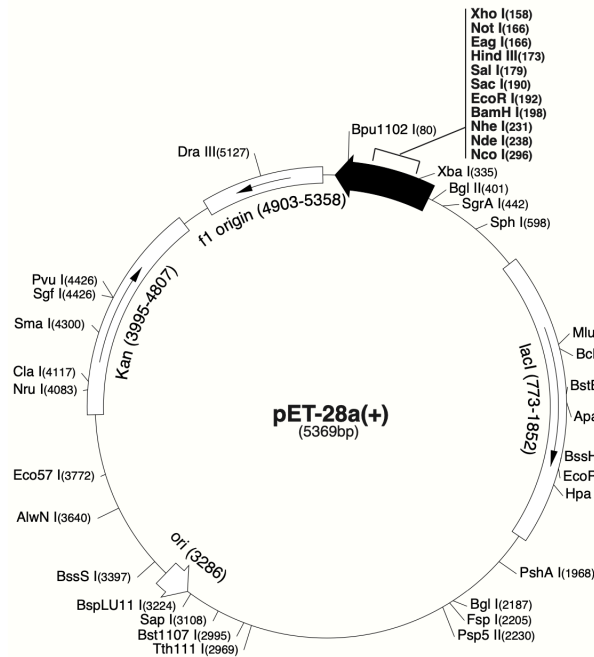


Fig. 15a: vettore pET-28a.

Tale ceppo era mancante di enzimi proteolitici in quanto era necessario per promuovere la overespressione della proteina di interesse. Come controllo è stato utilizzato il medesimo ceppo batterico, ma trasformato con il vettore che esprimeva solo HIS-tag.

Le cellule batteriche sono state incubate con 400 μ l di TBS + inibitore proteasi, si è poi aggiunto 400 μ l di Lysis buffer (LB) + inibitore proteasi e sono stati lasciati in ghiaccio per 30 minuti.

Step2:

Dal kit, sono stati prelevati 50 μ l di cobalto agar beads e sono state aggiunte alle colonne preventivamente assemblate. Sono stati effettuati 5 lavaggi di queste, con 400 μ l di soluzione Wash (TBS , lysis buffer in rapporto 1:1 più imidazolo 10mM)

Step3

Il lisato batterico è stato centrifugato per 5 minuti a 4°C, è stato prelevato il SN e messo in due eppendorf da 1,5mL in ghiaccio per poi centrifugarlo nuovamente per altri 5 minuti a 4°C. Il SN è stato diviso in 4 eppendorf nuove: in due è stato aliquotato circa 650 μ l dei campioni. 50 μ l sono stati usati come INPUT.

Step4:

I campioni sono stati aggiunti alle colonne per promuovere il legame His-Tag e cobalto. Le due colonne sono state messe in rotazione a 4°C per un'ora e mezza a 5 rpm

Step5:

Le cellule HT-22 sono state preparate come per l'immunoprecipitazione. Dopo essere state raccolte in TBS, sono state centrifugate a 1600 rpm 4°C per 5 minuti. Il pellet è stato prima risospeso in 1 mL di TBS + inibitore proteasi poi è stato miscelato con 1 mL di lysis buffer + inibitore proteasi e lasciato in ghiaccio per 30 minuti.

step6:

Le beads sono state lavate cinque volte sempre con la soluzione di Wash.

Step7:

Terminata la ultracentrifugazione delle cellule HT-22, sono stati prelevati 1600 μ l di SN ed è stato aggiunto 4 μ l di imidazolo (10mM). 800 μ l di lisato cellulare è stato aggiunto alle due colonne con le beads attivate. Sono stati lasciati in rotazione per un'ora e mezza a 4°C. In questo step si dovrebbe promuovere quindi il legame di MRTF o della actina alle molecole di CAP 1 immobilizzate sulle beads. Il primo flow-through è stato conservato come controllo per poi proseguire con 5 lavaggi.

step8:

L'eluizione è stata condotta usando 290mM di imidazolo. Per essere maggiormente precisi sono stati raccolti due eluati.

11.2 Colloidal staining

Il Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) ci ha permesso di indagare in modo qualitativo la quantità proteica presente nei miei campioni, in modo particolare eravamo interessati alla frazione di CAP1 nel sistema batterico.

È stato utilizzato un gel a gradiente 8-16% SDS-Page (Invitrogen) dove i campioni sono stati caricati e sottoposti a un campo elettrico di 120 Volt per i primi 30 minuti e poi di 140 Volt.

Come da protocollo è stato preparato il colorante, nella Tabella seguente sono riportati i componenti:

H2O MilliQ	27,5 mL
Metanolo	10 mL
Stain B	2,5 mL
Stain A	10 mL

Il gel è stato incubato sotto cappa nel mixer con il colorante per tutta la notte. Il giorno dopo sono stati eseguiti lavaggi con H2O MilliQ ogni 30 minuti per l'intera giornata.

12. Software d'immagine

Un aspetto interessante dello studio della proteina CAP (isoforma 1), è stato quello di andare a valutare la sua potenziali influenza nella morfologia neuronale, soprattutto a livello della differenziazione e sviluppo dendritico.

Parallelamente allo studio di CAP1 in cellule in vitro, è stata eseguita una analisi morfologica su neuroni murini da ippocampo CAP1 KO.

I campioni di cellule neuronali da analizzare erano disponibili presso laboratorio: i neuroni sono state prelevati da pups murini allo stadio di crescita E 18.5, trasfettate con costrutti eGFP-CRE e eGFP-CRE mutata come controllo, allo stadio DIV 6 e fissate sul vetrino al 16° giorno di coltura.

Tramite l'uso del microscopio confocale Zeiss LSM5 Pascal con ingrandimento 20X, si sono analizzati 4 batch cellulari composti ognuno da due condizioni : quella wild type e quella con CAP1 KO, e 3 batch cellulari con le condizioni CRE mutata + CAP1 e CRE + CAP1 per verificare se ci fosse un recupero della morfologia (rescue analysis) data la riespressione di CAP1. La selezione dei neuroni è stata eseguita seguendo i criteri riportati: dovevano presentare più di tre ramificazioni principali (meglio se con un albero dendritico sviluppato), un corpo cellulare presente ed uniforme, senza la presenza di corpi apoptotici visibili e soprattutto dovevano essere presenti le spine dendrite ad indicare che si trattava di un neurone eccitatorio utile all'analisi scartando così neuroni inibitori e cellule della glia. Le immagini sono state pertanto acquisite al microscopio, poi ripulite tramite l'utilizzo del software ImageJ così da evidenziare il neurone scelto (Fig.15) e quindi da sottoporlo all'analisi morfologica tramite il software WIS-NeuroMath.

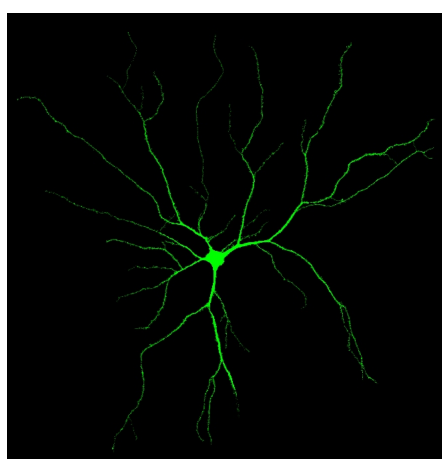


Fig. 15. Come appare la cellula dopo l'utilizzo del software ImageJ

RISULTATI

13. Attività di CAP1 in cellule non neuronali

13.1 Silenziamento dell'espressione di CAP1 e analisi

Allo scopo di comprendere il ruolo della proteina CAP1 nella omeostasi cellulare, abbiamo effettuato il silenziamento dell'mRNA di tale proteina mediante short hairpin RNA (shRNA).

Gli esperimenti sono stati condotti sia su cellule umane che murine ma di seguito saranno riportati solo i risultati ottenuti sulle due linee cellulari murine: HT-22 e m-Hypo in quanto sono state quelle a darci i risultati migliori.

Su queste due linee sono stati saggiati i costrutti plasmidici pSUPER_shRNA1 e pSUPER_shRNA4 in quanto, come riportato in "Materiali e Metodi", sono in grado promuovere il silenziamento del mRNA CAP1 murino.

Nella Fig. 16 sono mostrati i risultati dell'analisi in Wester Blot eseguita su lisati cellulari HT-22 raccolti 32 ore dopo la trasfezione. Come controllo (lane 1) è stato usato un costrutto shRNA che non provoca il silenziamento di nessun mRNA all'interno della cellula, ed è un controllo ampiamente usato all'interno del nostro laboratorio [19].

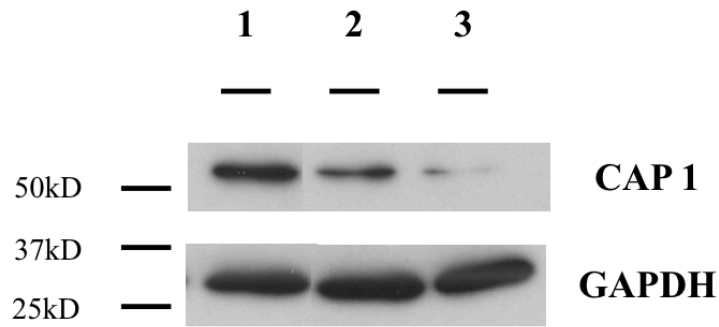


Fig. 16 *Western Blot*. Lane 1: lisato di cellule trattate con shRNA di controllo; lane 2: lisato di cellule trattate con pSUPER-shRNA_1 CAP1; lane 3: lisato di cellule trattate con pSUPER-shRNA_4 CAP1. GAPDH è stato usato come controllo.

Come possiamo apprezzare, c'è una evidente riduzione della proteina CAP1 nei campioni trattati.

Al fine di aumentare questa attività di silenziamento di CAP1 per avere un segnale certo e distinguibile in quello che sarebbe stato lo step successivo di analisi con l'enzima luciferasi, le cellule HT-22 e m-Hypo sono state trasfettate, utilizzando il sistema con la Lipofectamina 2000, con un cocktail dei costrutti shRNA_1 e shRNA_4 a due diverse concentrazioni. Lo stesso esperimento è stato condotto su cellule HeLa sottoposte ad un trattamento con un cocktail costituito da tutti e quattro i costrutti (shRNA_1,2,3,4), ma i risultati non sono riportati in quanto queste cellule hanno mostrato una

sensibilità importante al trattamento che ne ha determinato la morte massiva già dopo 12 ore.

Come possiamo apprezzare dalla Fig.17, l'utilizzo del cocktail di shRNA_1 e shRNA_4, in entrambe le linee cellulari testate, ha prodotto un effetto importante di down-regolazione.

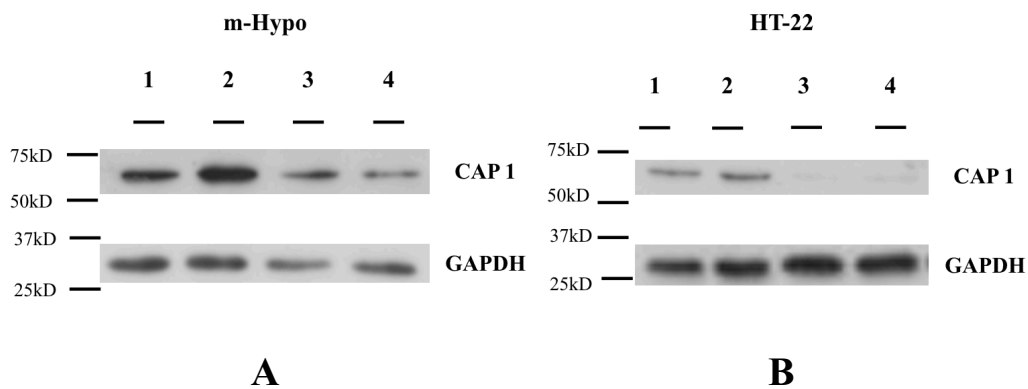


Fig.17 immagine A, m-Hypo: Lane 1: lisati di cellule trattate con il controllo (300 ng). Lane 2: lisati di cellule trattate con il controllo (500 ng). Lane 3: lisati cellulari trattati con 150 ng per singolo costrutto. Lane 4: lisati cellulari trattati con 250 ng per singolo costrutto.

Immagine B, HT-22: Le lane 1 e 2: lisati di cellule trattate con il controllo 500 ng(Lane 1) e 1300 ng(Lane 2). Lane 3: lisati cellulari trattati con 250 ng per costrutto. Lane 4: lisati cellulari trattati con 150 ng per costrutto.

Per verificare se l'effetto della deplezione di CAP 1 possa avere un'influenza sulla attività del co-fattore MRTF sono stati condotti esperimenti utilizzando un vettore contenente il gene reporter per l'enzima luciferasi di lucciola (Firefly). A monte del gene FLuc è presente il promotore del gene c-fos e le sequenze che permettono l'attivazione da parte del complesso MRTF-SRF mentre sono stati rimossi i siti di legame per l'altro co-fattore TCF. In Fig.18 possiamo osservare i risultati della quantificazione al luminometro dell'attività enzimatica in cellule knock- down CAP1.

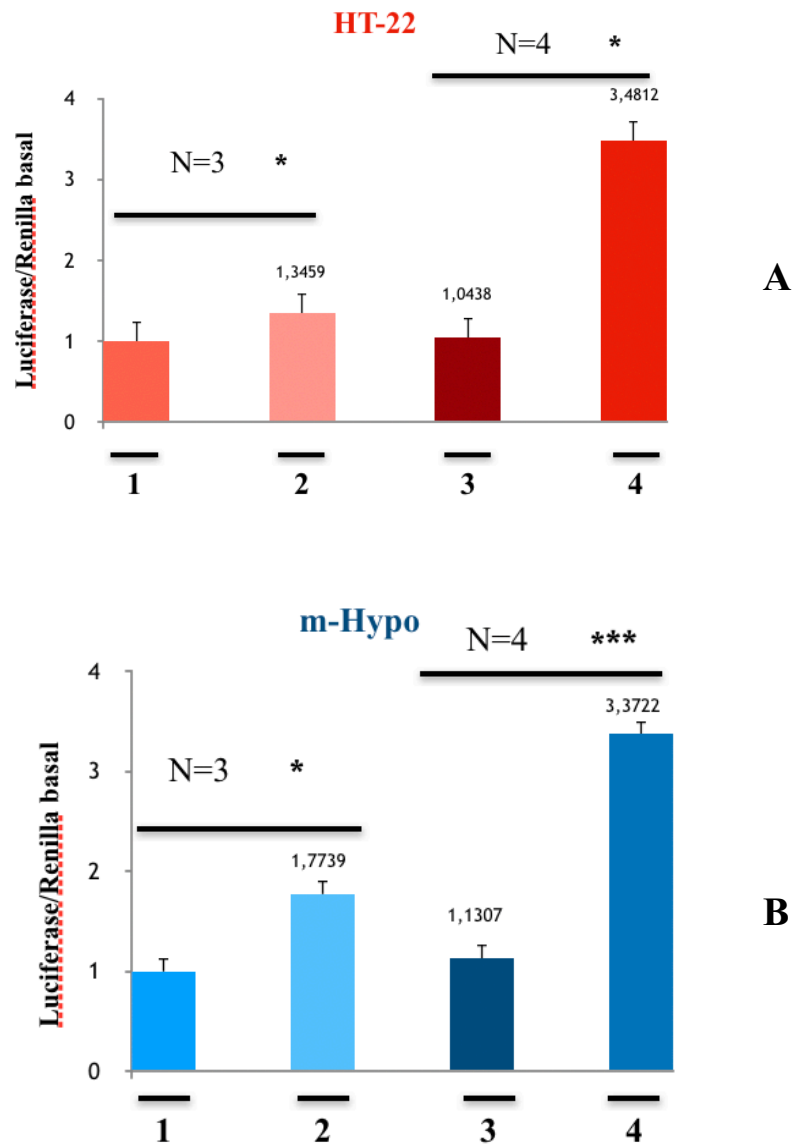


Fig.18 Attività enzima Luciferasi CAP1 KD. **Immagine A, HT-22:** Lane 1:lisati cellulari trattati con 300 ng del controllo. Lane 2: lisati cellulari trattati con 150 ng di shRNA1 e 150 ng shRNA4. Lane 3: lisati cellulari trattati con 500ng del controllo. Lane 4: come nella 3, ma le concentrazioni sono di 250 ng. **Immagine B, m-Hypo:**come nell immagine A

Come possiamo apprezzare dalla Fig.18, L'attività della FLuc è stata misurata, come descritto in Materiali e Metodi, ed è stata normalizzata rispetto a quella della Lucifersi di Renilla. I risultati, presentati nella Fig. 18, mostrano che i valori di attività della FLuc, sono incrementati di circa 3 volte rispetto al controllo, soprattutto per i campioni trattati con 500 ng di pSUPER shRNA.

14) Fattori interagenti con CAP1

I risultati precedenti potrebbero essere giustificati da una interazione specifica tra CAP1 e MRTF. Per verificare questa possibile interazione, sono stati allestiti test di Co-IP e Pull-Down. L'interazione tra CAP1 e G-actina è stata ben documentata in letteratura, pertanto è stata presa come controllo.

14.1) Co-IP

Dopo aver raccolto le cellule murine HT-22 previamente splittate in piastre da 150 mm ad una densità di 1.000.000 cell/piastra, queste sono state preparate per determinare l'isolamento del complesso CAP-MRTF.

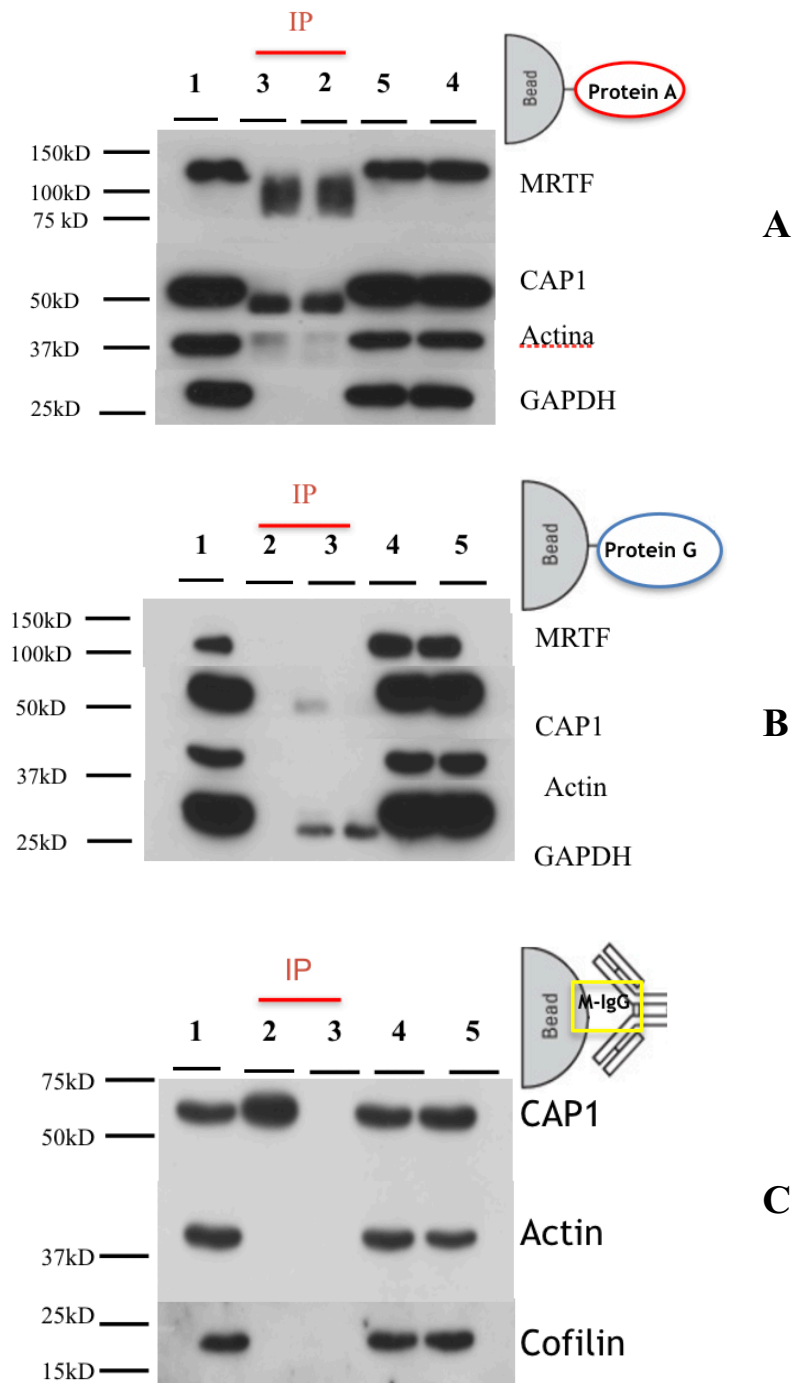


Fig 19:Wester Blot Co-IP. Lane 1: l'INPUT. Lane 2: l'eluato del controllo con le beads. Lane 3: l'eluato CAP 1. Lane 4: controllo sul surnatante del campione con solo le beads. Lane 5:controllo sul surnatante del campione CAP1. **A:** risultati con Dynabeads protein A. **B:** Dynabeads protein G. **C:** Dynabeads M-280

In Fig.19 sono riportati i risultati Western blot del immunoprecipitato di cellule HT-22. Come si osserva, nessuna delle beads utilizzate, hanno prodotto una soddisfacente immunoprecipitazione del complesso CAP1-MRTF. Per quanto riguarda le Dynabeads M-280 Sheep antimouse IgG possiamo vedere che l'immunoprecipitazione di CAP1 è risultata essere molto efficiente, ma non si hanno segnali di partner proteici; per cui è necessaria una ottimizzazione di questo protocollo per cercare di evidenziare eventuali legami a CAP1 oppure l'interazione tra le due proteine non è diretta.

Infine per quanto riguarda Dynabeads protein G non abbiamo ottenuti risultati soddisfacenti in quanto la IP di CAP1 è molto limitata ed inoltre sono presenti aspecifici quali GAPDH. Aspecifici li abbiamo riscontrati anche con l'utilizzo di Dynabeads protein A.

14.2) Pull Down

per cercare di ottenere informazioni su un possibile complesso CAP1 MRTF abbiamo deciso di condurre un esperimento di Pull Down. Dopo aver incubato le beads di agar con il lisato batterico (ceppo E. coli Rosetta) che over esprimeva CAP1-HIS tag, sono state fatte reagire con il lisato cellulare di HT-22. Come controllo è stato usato un campione batterico che esprimeva solo HIS-tag.

Sfortunatamente anche in questo caso dopo aver caricato i campioni in gel SDS-Page 4% ed eseguito un Western Blot, abbiamo verificato che la frazione di CAP1 effettivamente legata alle beads era veramente bassa. Questa potrebbe essere una spiegazione del fatto che non sono state rilevate tracce di altre proteine, tra quelle saggiate, che avevano legato CAP1, come possiamo osservare nella Fig. 20. La lane 8 è il WCL (whole cell lisate) ovvero il lisato cellulare di HT-22 post centrifugazione e mi permette di se in questo step è stato perso materiale.

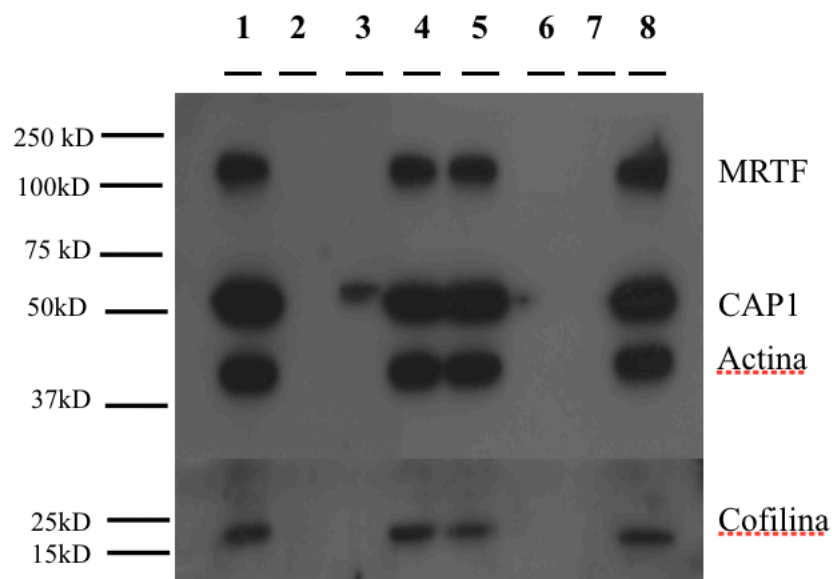


Fig.20: WB Pull Down: Lane 1: INPUT. Lane 2 primo eluato del controllo. Lane 3: primo eluato di CAP1. Lane 4: flow-through del controllo. Lane 5: flow through di CAP1. lane 6 secondo eluato di CAP1. Lane 7 secondo eluato del controllo. Lane 8 :WCL (whole cell lisate) controllo.

Per la detection sono stati utilizzati gli stessi anticorpi usati per il Co-IP.

Per andare ad indagare in modo qualitativo la presenza di CAP1 nel sistema batterico utilizzato, è stato allestito un Colloidal staining, ed abbiamo scoperto che nei lisati cellulari usati, la presenza di CAP1(banda da 50kDa) era minima (Fig.21). La spiegazione che ci siamo dati è che non è stata effettuata una lisi batterica adeguata tale da permettere il rilascio della proteina e siamo abbastanza sicuri che il sistema batterico utilizzato esprima i plasmidi in quanto internamente al laboratorio sono stati già utilizzati gli stessi batch cellulari con risultati positivi.

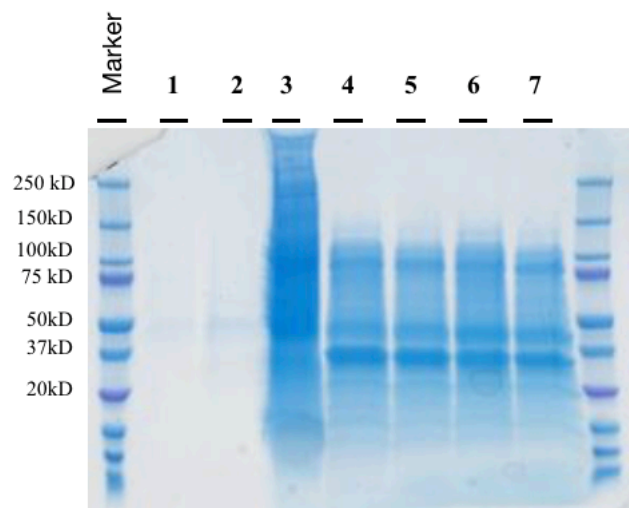


Fig.21: Gel Colloidal Staining

14.3 Analisi morfologica-dendritica in neuroni CAP1 KO

Abbiamo, infine, voluto valutare il ruolo potenziale di Cap1 sulla morfologia neuronale, soprattutto a livello della differenziazione e sviluppo dendritico.

Parallelamente allo studio di CAP1 in cellule in vitro, è stata eseguita, a questo scopo, un'analisi morfologica su neuroni da ippocampo ottenuti da topi knock-out per CAP1.

L'utilizzo del software WIS-NeuroMath ci ha permesso di eseguire l'analisi vera e propria dei campioni. Il settaggio usato è stato riportato in tabella:

Noise level	1
Measure type	Cell morphology
Segmentation type	Threshold
min. Cell intensity	50
min. Area	100
Max area	600
Min. diameter	5
max. Axial ratio	10
min. Neurite length	32

I parametri cellulari analizzati sono stati:

- 1) Lunghezza totale (Total length)
- 2) Numero ramificazioni principali (n. Primary branch)
- 3) Lunghezza del neurite più lungo (longest branch length)

- 4) Numero dei punti di ramificazione principali.
- 5) Lunghezza massima del processo
- 6) Complessità delle ramificazioni
- 7) Lunghezza media tra i processi neuronali
- 8) Lunghezza media dei processi più lunghi

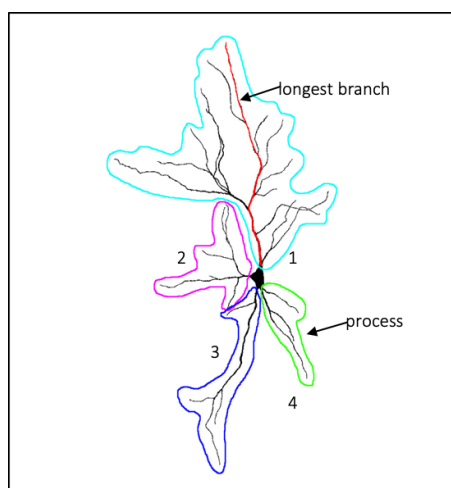


Fig. 22: delimitati con le varie colorazioni possiamo vedere i principali processi cellulari

Come si evince dai risultati ottenuti, CAP1 sembra influenzare minimamente i punti 1,3 e 5. Pertanto, tale proteina sempre essere indispensabile per la determinazione della morfologia dendritica in neuroni di ippocampo.

Andando ad analizzare più nel dettaglio i grafici sottostanti, possiamo dire che:

La lunghezza totale dei neuroni CAP1 KO viene influenzata quando c'è la deplezione di tale proteina infatti come possiamo osservare nella Fig.23 A, la funzione è parzialmente ripresa quando CAP1 viene reintrodotta nelle cellule neuronali. Anche per quanto riguarda la lunghezza massima del processo neuronale (Maximum process length), vediamo in B, che l'assenza di CAP determina una diminuzione di tale lunghezza che però non sembra essere ripristinata al momento nel saggio di rescue. Per quanto riguarda gli altri parametri, non c'è variazione significativa di questi.

È bene precisare che in questo tipo di analisi, hanno una validità maggiore parametri come: lunghezza totale, lunghezza media tra i processi dendritici (longest process length), lunghezza media del neurite più lungo all'interno di ogni processo per singola cellula . Questi sono quindi valori che derivano da un calcolo medio e pertanto l'effetto eventuale della rimozione di CAP1 da questi neuroni **C** assume un significato statistico maggiore.

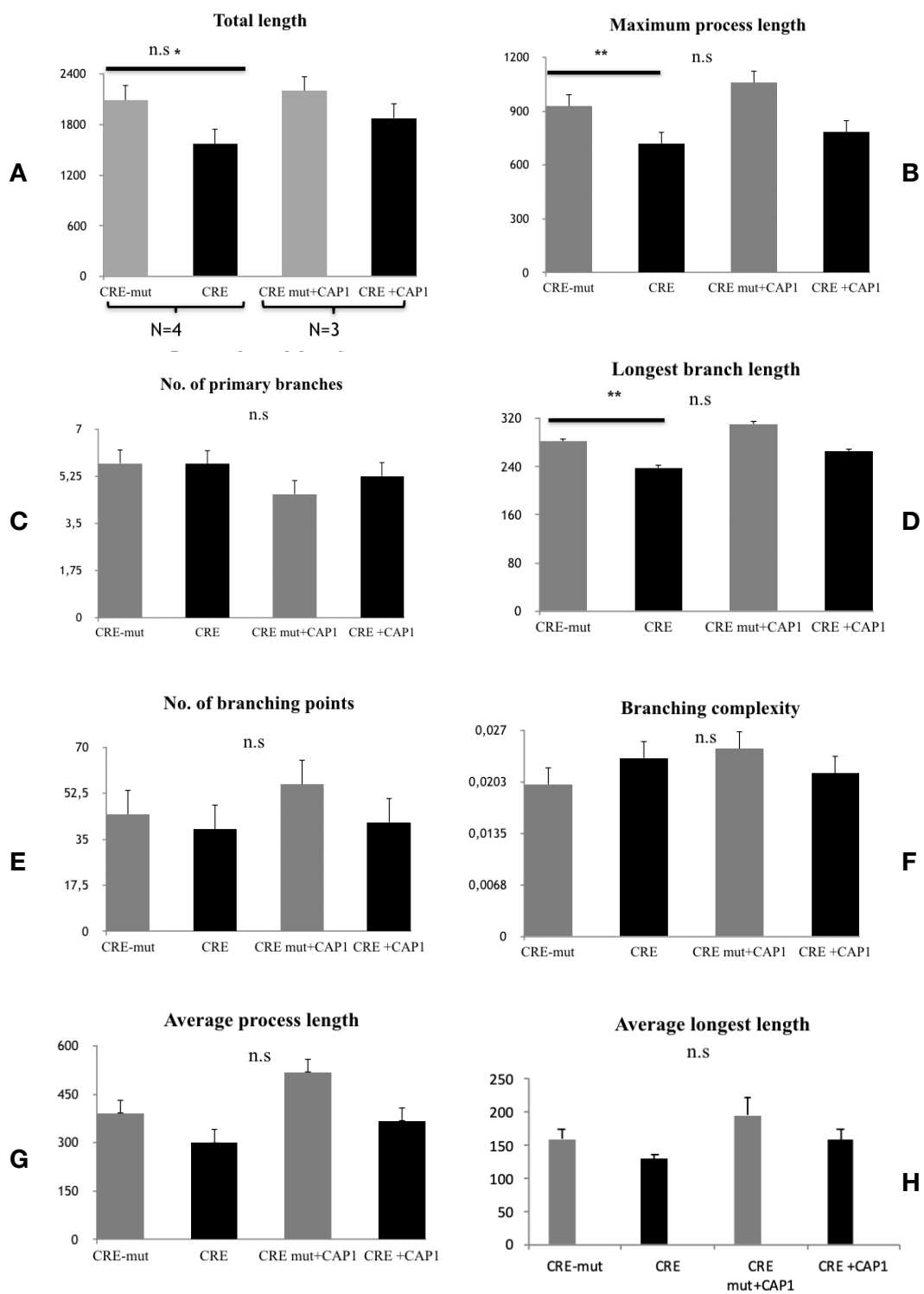


Fig. 23: Analisi dendritica neuroni E 18.5 topo. Le barre di errore sono riferite al calcolo della SEM.

DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

I risultati ottenuti con i costrutti pSUPER-shRNA_1 e pSUPER-shRNA_4 nella linea cellulare murina HT-22, pongono le basi per ulteriori e più approfondite indagini sull'effettivo ruolo di CAP1 nella morfogenesi neuronale. Questo allo scopo di creare un sistema modello in vitro per lo studio dei principali pathway nei quali CAP1 è coinvolta.

Dai dati ottenuti con il saggio di Luciferasi è possibile dedurre che probabilmente bassi livelli di CAP1 creino uno squilibrio tra la forma globulare e filamentosa della actina, determinando così una maggiore propensione per il fattore MRTF ad entrare nel nucleo, legarsi al fattore SRF e promuovere così l'espressione dell'enzima. L'esatto meccanismo d'azione rimane ad oggi elusivo.

È utile precisare che, studi condotti a livello neuronale, hanno dimostrato che l'uso del costrutto CAP1-Myc con il tag posto sia all'estremità N-ter, che C-ter è stato in grado di essere funzionale e di determinare un rescue delle funzionalità della proteina in neuroni KO CAP1. Per questa ragione, non c'è motivo di credere che l'assenza di efficienza di binding soprattutto con l'actina nel saggio di Pull Down, sia dovuto ad un problema di interferenza del tag.

Gli step di indagine successivi potrebbero essere:

- Utilizzo del sistema Luciferasi-Renilla usando dei costrutti shRNA-CAP1 mutati, che non sono in grado quindi di produrre un silenziamento genico. In questo modo potremmo andare a validare i risultati ottenuti nei precedenti esperimenti con la luciferasi
- Ottimizzare il protocollo di Co-IP o Pull Down, per individuare le proteine che interagiscono con CAP1. Si potrebbe partire dalla variazione della concentrazione salina dei buffer utilizzati nella procedura.
- Eseguire un esperimento di Co-IP su cellule HT-22 che overesprimono MRTF-HA ed CAP1-Myc così da eseguire diversi test di immunoprecipitazione
- Una volta ottenuta la precipitazione del complesso CAP1-MRTF (se effettivamente è questa l'interazione che avviene) sarebbe ideale trattare le cellule HT-22 con dei peptidi progettati dal professore Daniele Di Marino, in grado di perturbare l'interazione tra CAP1 e la G-actina e andarne a testare gli effetti tramite un Luciferase Assay.

BIBLIOGRAFIA

1. Phillips M, Pozzo-Miller L. (2015) *Dendritic spine dysgenesis in Autism Related Disorders*, Elsevier , **Neuroscience Letter**,**5;601:30-40**
2. Parekh R, Ascoli GA. (2013) *Neuronal Morphology goes Digital: A Research Hub for Cellular and System Neuroscience*, Elsevier, **Neuron**, **10;78(1):206**.
- 3 Dominguez R, Holmes KC (2011) *Actin structure and function*, **Annual review of biophysics**, **40:169-186**
4. Pollard TD, Borisy GG.(2003), *Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments*, **Cell**, **16;113(4):549**.
5. Bernstein BW, Bamburg JR.(2010), *ADF/Cofilin: A Functional Node in Cell Biology*, Elsevier, **Trends in cell biology**, **20: 187-195**
6. James R. Bamburg, Barbara W. Bernstein (2016), *Actin dynamics and cofilin-actin rods in Alzheimer disease*, **Cytoskeleton** **73:477-497**

7. Xie S, Shen C, Tan M, Li M, Song X, Wang C.(2017), *Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes of adenylate cyclase-associated protein in cancer*, **Oncotarget**, **18;8(16):27216-27239**.

8. Wu H., Hasan R., Zhang H., Gray J., Williams D., Miller M., Allen F., Lee V., Kelly T., Zhou GL. (2019), *Phosphorylation regulates cap1 (cyclase-associated protein 1) functions in the motility and invasion of pancreatic cancer cell*, **Scientific reports**, **9: 4925**.

9. **Hasan R. ,Zhou GL.(2019)** *The Cytoskeletal Protein Cyclase-Associated Protein 1 (CAP1) in Breast Cancer: Context-Dependent Roles in Both the Invasiveness and Proliferation of Cancer Cells and Underlying Cell Signals*, **International journal of molecular sciences**,

10. Zhang H., Zhou GL. (2016), *CAP1 (cyclase-associated protein 1) exerts distinct functions in the proliferation and metastatic potential of breast cancer cells mediated by ERK*, **Scientific reports**.

11. Xie S, Liu Y, Li X, Tan M, Wang C, Field J, Zhou GL.(2018), *Phosphorylation of the Cytoskeletal Protein CAP1 Regulates Non-Small Cell Lung Cancer Survival and Proliferation by GSK3 β* , **Journal of Cancer**, **16;9(16):2825-2833.**

12. Hua M1, Yan S1, Deng Y1, Xi Q1, Liu R2, Yang S3, Liu J1, Tang C1, Wang Y4, Zhong J1.(2015),*CAP1 is overexpressed in human epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation*,**International Journal of Molecular Medicine**,**35(4):941-9.**

13. XF Yu, QC Ni, JP Chen, JF Xu, Y Jiang, SY Yang (2014), *Knocking down the expression of adenylate cyclase-associated protein 1 inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells* ,*Experimental and molecular pathology*, **Elsevier**, **96: 188-194**

14. K Yamazaki, M Takamura, Y Masugi, T Mori (2009), *Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility*, **Nature**, **89**: 425–432

15. GV Kakurina, ES Kolegova, IV Kondakova, (2018), *Adenylyl cyclase-associated protein 1: Structure, regulation, and participation in cellular processes*, **Springer Biochemistry**, **83**: 45–53

16. Wang C, Zhou GL, Vedantam S, Li P, Field J.(2008), *Mitochondrial shuttling of CAP1 promotes actin- and cofilin-dependent apoptosis*, **Journal of Cell Science**, **121**: 2913-2920

17. M Tan, X Song, G Zhang, A Peng, X Li (2013), *Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 is associated with metastasis of lung cancer*, **Oncology**,**30(4):1639-44**

18. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA (2006), *Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer*. **Science**,311(5758):195-8.
19. Bicker S., Khudayberdiev S., Weiß K. , Zocher K, Baumeister S.and Schratt G. (2013), *The DEAH-box helicase DHX36 mediates dendritic localization of the neuronal precursor-microRNA-134*. **Genes and Development**, 15;27(14):1633.
20. Ono S. (2013), *The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics—more than a monomer-sequestration factor*, **Journal of cell science**,126: 3249-3258
23. Jansen S, Collins A, Golden L, Sokolova O, Goode BL (2014), *Structure and mechanism of mouse cyclase-associated protein (CAP1) in regulating actin dynamics*, **Journal of Biological Chemistry**, 31;289(44)

21. Quintero-Monzon O, Jonasson E.M et al.(2009), *Reconstitution and Dissection of the 600-kDa Srv2/CAP Complex: Roles for oligomerization and Cofilin-actin binding in driving actin turnover*, **Journal of Biological Chemistry** ,1 7;284(16):10923-34
22. Purde V., Busch F., Kudryashova E., Wysocki VH. (2019), *Oligomerization Affects the Ability of Human Cyclase-Associated Proteins 1 and 2 to Promote Actin Severing by Cofilins*, **International journal of molecular science**.
23. Jansen S., Collins A., Golden L., Sokolova O., Goode BL.(2014), *Structure and mechanism of mouse cyclase-associated protein (CAP1) in regulating actin dynamics*. **Journal of Biological Chemistry**, 289(44):30732-42

24. Chua BT, Volbracht C, Tan KO, Li R, Yu VC, Li P. (2003), *Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction*, **Nature cell biology** 5,1083–1089
25. Frampton G., Moriya, S. Et al.(2000). *Identification of candidate endothelial cell autoantigens in systemic lupus erythematosus using a molecular cloning strategy: a role for ribosomal P protein P0 as an endothelial cell autoantigen*. **Rheumatology, (Oxford) 39, 1114-1120.**
26. Kinloch A1, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, et al.(2005). *Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis*. **Arthritis Research and Therapy, 7(6):R1421-9.**
27. Kotila T., Wioland H., et al. (2019),*Mechanism of synergistic actin filament pointed end depolymerization by cyclase-associated protein and cofilin*. **Nature, 5320**

28. Posern G., Treisman R. (2006), Actin'together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction, *Trends in cell biology*, Elsevier, 16:588-596,
29. Miano JM., Long X., Fujiwara K. (2007), Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus, *American Journal of Physiology-Cell*, 292(1):C70-81
30. Knöll, B., Nordheim A.(2009), Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm, *Trends in neurosciences*, Elsevier,32(8):432-42
31. Knöll B.(2010), Actin-mediated gene expression in neurons: the MRTF-SRF connection, *Biological chemistry*,391(6):591-7
32. Gau D., Roy P. (2018), SRF'ing and SAP'ing – the role of MRTF proteins in cell migration, *Journal of Cell Science*, 131: jcs218222

33. Bezanilla M., Gladfelter AS., Kovar DR., Lee WL. (2015) *Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane*, **Journal of Cell Biology** 209 (3): 329–337.
34. Gualdrini F., Esnault C., Horswell S. et al. (2016), *SRF co-factors control the balance between cell proliferation and contractility*, **Molecular cell**, Elsevier, 64(6): 1048–1061.
35. Zaromytidou AI., Miralles F., Treisman R (2006), *MAL and Ternary Complex Factor Use Different Mechanisms To Contact a Common Surface on the Serum Response Factor DNA-Binding Domain*, **Molecular and cellular Biology**, MCB.01902-05
36. Esnault C, Stewart A, Gualdrini F, East P, Horswell S, Matthews N, Treisman R. (2014), *Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts*, **Genes and Development**, 28(9):943-58.

37. Murai K, Treisman R. (2002), *Interaction of serum response factor (SRF) with the Elk-1 B box inhibits RhoA-actin signaling to SRF and potentiates transcriptional activation by Elk-1*, **Molecular and cellular biology**, **22(20):7083-92**

38. Wioland H, Guichard B, Senju Y, Myram S, Lappalainen P, Jégou A, Romet-Lemonne G. (2017) *ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends*, **Current Biology**, **27:1956-1967**

39. Jansen S, Collins A, Golden L, Sokolova O, Goode BL (2014), *Structure and mechanism of mouse cyclase-associated protein (CAP1) in regulating actin dynamics*, **Journal of Biological Chemistry**, **289(44):30732-42**

40. Iwase S., Ono S(2017), *Conserved hydrophobic residues in the CARP/ β -sheet domain of cyclase-associated protein are involved in actin monomer regulation*, **Cytoskeleton**, **74(9):343-355**
41. Elam WA, Kang H, De la Cruz EM. (2013), *Biophysics of actin filament severing by cofilin*, **FEBS Letters**, **587(8):1215-9**
42. Kotila T., et al.(2018),*Structural basis of actin monomer re-charging by cyclase-associated protein*, **Nature**, **1892**
43. Gurbuz I, Ferralli J, Roloff T, Chiquet-Ehrismann R1, Asparuhova MB (2014),*SAP domain-dependent Mkl1 signaling stimulates proliferation and cell migration by induction of a distinct gene set indicative of poor prognosis in breast cancer patients*, **Molecular Cancer**,**13: 22**
44. Xie SS., Tan M., et al. (2015), *Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 may predict brain metastasis in non-small cell lung cancer*. **Oncology**, **33:363-371**

45. Curran T., Peters G., Van Beveren C., Teich Nm., Vermal IM.(1982), *FBJ Murine Osteosarcoma Virus: Identification and Molecular Cloning of Biologically Active Proviral DNA*, **Journal of Virology**, **674-682**
46. Katarzyna K., Giorgi K., Jing-Juan Z., Hetman M. (2006), *Role of Megakaryoblastic Acute Leukemia-1 in ERK1/2-Dependent Stimulation of Serum Response Factor-Driven Transcription by BDNF or Increased Synaptic Activity*, **The Journal of Neuroscience**, **26 (39) 10020-10032**
47. Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P. (2004), *Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Promotes Cofilin-induced Actin Dynamics in Mammalian Nonmuscle Cell*, **Molecular Biology of the Cell**, **15 (5):2324-34**
48. Bao Z1, Qiu X2, Wang D3, Ban N4, Fan S4, Chen W4, Sun J4, Xing W1, Wang Y1, Cui G5.(2015), *High expression of adenylate cyclase-associated protein 1 accelerates the proliferation, migration and invasion of neural glioma cells*, **Elsevier**, **212: 264-273**

RINGRAZIAMENTI

Anche se questa bellissima e breve esperienza è giunta al termine, non posso non essere grata alle persone che l'hanno resa possibile: la prof.ssa Anna La Teana ed il prof. Daniele Di Marino che hanno creduto in me e che hanno rappresentato un costante punto di riferimento. Al Prof. Dr. Marco Rust per avermi accolta presso il suo laboratorio e avermi messo a disposizione tutti i mezzi necessari per poter condurre il mio progetto di tesi.

Rivolgo un sentito ringraziamento al mio meraviglioso supervisore Sharof Khudayberdiev, che mi ha guidata ed istruita nel miglior modo possibile durante tutto il mio soggiorno.

Ultimi ma non per importanza, ringrazio con tutto il cuore le persone che mi sono state vicine in questi anni: la mia famiglia allargata e le amiche di una vita.