

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA IN
PATOLOGIA E FISIOPATOLOGIA MOLECOLARE
XVIII CICLO**



**RUOLO DELLA CHINASI CALCIO-CALMODULINA-DIPENDENTE
DI TIPO II (CAMKII) NEL SEGNALE RAS-ERK.**

Coordinatore:

Ch.mo Prof.

Vittorio E. Avvedimento

Candidata:

Dott.ssa Anna Lina Cavallo

DOCENTE GUIDA:

Ch.mo Prof. Mario Vitale

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

al mio primo figlio.

INDICE

INTRODUZIONE	<i>pag. 4</i>
<i>Il segnale Ras.</i>	<i>pag. 7</i>
<i>Le CaMKs.</i>	<i>pag. 9</i>
SCOPO DELLA TESI	<i>pag. 15</i>
MATERIALI E METODI	
<i>Culture cellulari.</i>	<i>pag. 16</i>
<i>Western blot e Immunoprecipitazione.</i>	<i>pag. 16</i>
<i>Incorporazione di timidina triziata.</i>	<i>pag. 17</i>
<i>Saggio di attività di PKC.</i>	<i>pag. 17</i>
<i>Saggio di attività di CaMKII.</i>	<i>pag. 18</i>
<i>Saggio di attività di Ras.</i>	<i>pag. 19</i>
RISULTATI	
<i>L'insulina induce la fosforilazione di Erk e di Akt/PKB nelle cellule L6.</i>	<i>pag. 20</i>
<i>La stimolazione insulinica induce un aumento della concentrazione intracellulare di calcio e l'attivazione della CaMK di tipo II.</i>	<i>pag. 21</i>
<i>L'inibizione di CaMKII inibisce selettivamente la fosforilazione di Erk stimolata dall'insulina.</i>	<i>pag. 23</i>
<i>PKCβI è responsabile della fosforilazione di Erk indotta dall'insulina.</i>	<i>pag. 24</i>
<i>L'insulina stimola l'associazione di CaMKII e PKCβI con Raf-1.</i>	<i>pag. 26</i>
<i>L'inibizione di CaMKII riduce significamene l'incorporazione di timidina triziata.</i>	<i>pag. 27</i>
DISCUSSIONE	<i>pag. 29</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 37</i>
PUBBLICAZIONI	<i>pag. 41</i>

INTRODUZIONE

L'attivazione dei recettori per i fattori di crescita così come quella del recettore integrinico genera non solo l'induzione della via Ras/Erk ma anche l'attivazione della via del calcio⁽¹⁾.

È noto che la fosfolipasi C ϵ agisce come effettore con cui Ras mobilizza il calcio dalle riserve⁽²⁾. Il segnale della PLC è regolato dai secondi messaggeri: il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo-3-fosfato (IP3). Il DAG rimane localizzato sulla membrana, così da mediare l'associazione della proteina chinasi C (PKC) alla membrana cellulare, seguita dalla sua attivazione, dando avvio ad una catena di fosforilazioni, che concorreranno alle risposte funzionali della cellula. L'IP3 è un messaggero intracellulare citoplasmatico, che interagisce con il corrispondente recettore del reticolo endoplasmatico liscio causando la liberazione del calcio (Ca²⁺) immagazzinato e, quindi, l'innalzamento della concentrazione stessa del Ca²⁺ intracellulare.

In condizioni basali il calcio intracellulare viene mantenuto ad una concentrazione inferiore a quella dell'ambiente extracellulare grazie ad un sistema di canali regolati da diversi fattori interni ed esterni alla cellula^(3,4). Questo incremento della concentrazione del calcio intracellulare, parallelo all'attivazione della via Ras/Erk, ci ha indotto a ipotizzare una possibile cooperazione tra queste due vie sostenuta da proteine che controllano la proliferazione cellulare e che vengono attivate dal calcio.

Il più importante recettore intracellulare per il Ca²⁺ è la calmodulina, una piccola proteina ubiquitaria che possiede due domini leganti ciascuno 2 ioni calcio e un dominio cerniera intermedio. Il legame di 4 ioni calcio determina un cambiamento della struttura terziaria della calmodulina che, ruotando sul dominio cerniera, ne consente l'interazione con i suoi substrati. Tra questi substrati vi sono le

chinasi calcio-calmodulina dipendenti (CaMKs), le quali vengono attivate solo in presenza di calmodulina legata al calcio. La CaMK di tipo II è una chinasi calcio/calmodulina dipendente ubiquitaria la cui funzione era fino ad ora prevalentemente limitata al sistema neuronale o era coinvolta nei meccanismi di controllo della motilità delle cellule del sistema reticolo endoteliale.

Precedentemente abbiamo dimostrato che in cellule Tad-2 (linea cellulare di tiroide) l'attivazione integrinica mediante fibronectina oltre ad attivare la via Ras/Erk genera un segnale ausiliario del calcio⁽⁵⁾. La stimolazione integrinica promuove l'attivazione di Ras che attiva la chinasi serina-treonina Raf-1 che a sua volta attiva MEK e da questa viene attivata Erk, parallelamente è stato osservato un incremento della concentrazione intracellulare di calcio e l'aumento dell'attività di CaMKII.

Esperimenti condotti utilizzando gli inibitori di CaMKII, sia quello farmacologico, il KN93, sia il peptide specifico inibitorio, l'AntCantide, hanno dimostrato una forte riduzione dei livelli di fosforilazione di Erk indotta dalla stimolazione integrinica con fibronectina dimostrando così che esiste un'interazione tra il segnale del calcio e la via MAPK⁽⁵⁾ (Figure 1, 2).

Per definire quale tra le chinasi del pathway Ras/Raf-1/Mek/Erk fosse possibile bersaglio di CaMKII è stata misurata l'attività delle chinasi in presenza degli inibitori di CaMKII. L'inibizione di CaMKII riduceva l'attività di Raf-1 mentre non aveva alcun effetto sulle alte chinasi dimostrando così che il punto di contatto tra la via Ras/Erk e la via del calcio è rappresentato da Raf-1, tale interazione avviene con la formazione di un complesso CaMKII/Raf-1⁽⁵⁾.

L'osservazione fatta nelle cellule tiroidee stimulate dalle integrine ha assegnato quindi alla CaMKII un nuovo importante ruolo nel controllo di altri segnali, rendendo questa chinasi importante anche nella proliferazione indotta dalla matrice extracellulare nella cellula tiroidea.

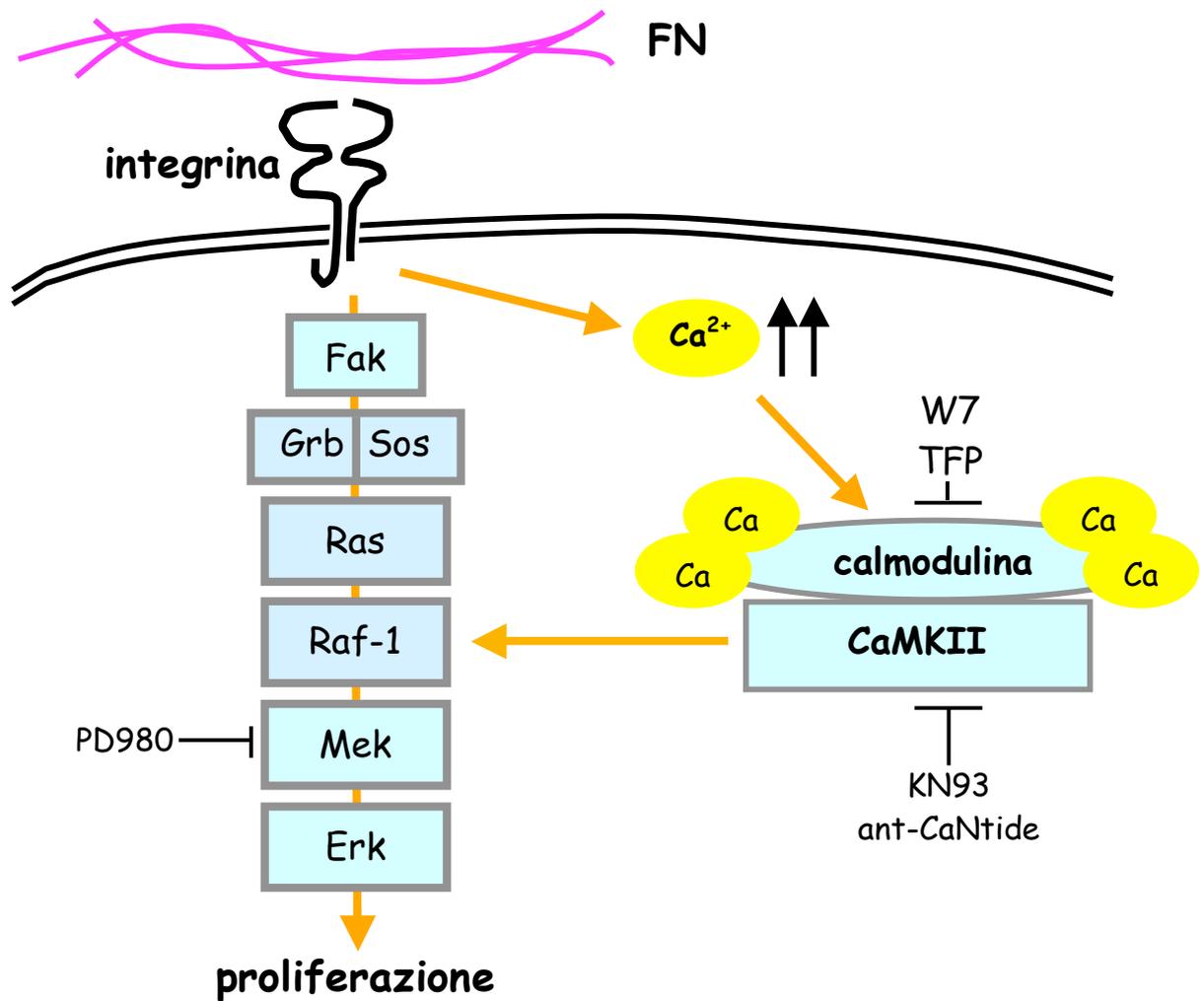


Figura 1: Rappresentazione schematica del cross-talk tra calcio/Calmodulina/CaMKII ed il pathway Ras/Erk nella stimolazione integrinica indotta da fibronectina.

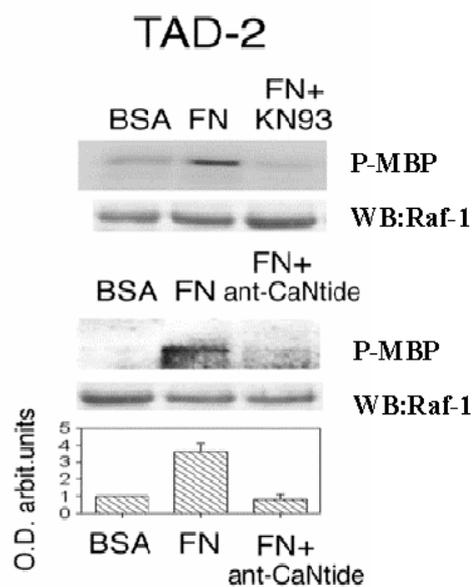


Figura 2: L'inibizione di CaMKII abroga l'attivazione di Raf-1 indotta da Fibronectina.

Il segnale Ras.

La trasmissione dei segnali extracellulari indirizzata al proprio target intracellulare è mediata da un insieme di proteine che, interagendo tra loro, governano un largo numero di processi cellulari come la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza⁽⁶⁾.

Tra le vie di segnale è di particolare interesse quella indotta da fattori di crescita poiché l'alterata regolazione di questi processi di trasduzione spesso porta alla trasformazione cellulare. L'interazione dei recettori per fattori di crescita con i rispettivi ligandi determina l'inizio della cascata enzimatica che conduce all'attivazione di una via conosciuta come la via della MAPK che culmina con la fosforilazione di ERK1 e ERK2⁽⁷⁾.

Ras è il principale mediatore dei segnali intracellulari che vanno dalla membrana al nucleo. La sua attivazione è seguita da una serie di fosforilazioni a catena che coinvolgono le tre MAPK chinasi: Raf-1, MEK (*mitogen extracellular signal regulated kinase*) ed ERK (*extracellular signal regulated kinase*)⁽⁸⁾.

Dopo l'interazione con il ligando, il recettore dimerizza e si autofosforila a livello dei residui di tirosina presenti nella regione C-terminale del recettore; il processo di dimerizzazione è importante per l'attivazione del dominio chinasi⁽⁹⁾. L'attività tirosin-chinasi del recettore è essenziale per mediare l'azione del fattore di crescita e, altrettanto importante per la trasduzione del segnale, è l'autofosforilazione del recettore stesso. I residui di tirosina fosforilati diventano infatti dei siti di legame specifici per proteine che contengono domini SH-2 (Src Homology-2)⁽¹⁰⁾. Una delle proteine che contiene domini SH-2 è l'adattatore GRB2, legato al fattore di scambio per nucleotidi guaninici Sos1, mediante i domini SH-3 (Src Homology-3)^(11,12). In seguito alla stimolazione con il fattore di crescita, il complesso GRB2-Sos1 si lega alle tirosine fosforilate del dominio C-terminale del

recettore stesso. Grazie a questa interazione, Sos1 viene portato dal citoplasma alla membrana cellulare dove può attivare Ras catalizzandone il passaggio dalla forma inattiva Ras-GDP, alla forma attiva Ras-GTP. Il legame al GTP rende Ras attivo e ne fa variare la sua conformazione; tale cambiamento conformazionale permette a Ras di legare Raf-1 che viene così traslocato alla membrana.

Esistono tre isoforme di Raf, A, B e C, che si distinguono in base all'attività chinasi basale e alle modalità di attivazione da parte di diverse molecole^(13,14). È noto che diverse chinasi, tra cui la Proteina Chinasi A (PKA), Pak3, la Proteina chinasi C (PKC), AKT, e Src, fosforilano Raf. Fosforilazioni in siti diversi di Raf portano a diversi stati di attivazione della proteina stessa⁽¹⁵⁾. Siti importanti per l'attivazione di Raf-1 sono la serina 338 (Ser 338) e la tirosina 341 (Tyr 341)⁽¹⁶⁾. È stato dimostrato che la co-espressione di Raf-1 e Ras oncogenico porta prevalentemente alla fosforilazione di Raf a carico della Ser 338, mentre la co-espressione di Raf-1 con Src porta alla fosforilazione di Raf a carico della Tyr 341. L'attività di Raf-1 è massima solo quando è fosforilata in entrambi i siti. La Ser 338 viene anche fosforilata da Pak 3 sia *in vitro* che *in vivo* quando Raf-1 è attivato da Ras oncogenico⁽¹⁷⁾. Un'altra importante famiglia di proteine che regolano l'attivazione di Raf-1 è quella delle 14-3-3, che si legano in due siti di Raf-1 e precisamente a due serine fosforilate: la 259 e la 621. La regolazione dell'attività di Raf-1 è molto complicata poiché il legame delle 14-3-3 al dominio N-terminale sembra inibire l'attività di Raf-1, mentre il legame al sito C-terminale è essenziale per la sua attività^(18,16). Allo stesso tempo, la defosforilazione dello stesso Raf-1 inibisce il suo legame alle suddette 14-3-3.

Il substrato di Raf è costituito da una famiglia di chinasi in grado di fosforilare le MAPK sia in serina che in treonina (MEK o MAPKK) che, benché dotate di una duplice funzione di chinasi, sono altamente selettive per i loro substrati. Ad esempio, MEK1 e MEK2 fosforilano e attivano solo ERK1 ed ERK2 e nessun altro membro della famiglia delle MAPKs^(19,20).

Le CaMKs.

Il Ca^{2+} è un importante mediatore dei segnali intracellulari e variazioni nella sua concentrazione rivestono un ruolo fondamentale in una vasta gamma di funzioni biologiche incluse la trascrizione, il ciclo cellulare, l'apoptosi, la sintesi proteica, l'esocitosi, la proliferazione e il differenziamento.

La concentrazione intracellulare di Ca^{2+} nel citoplasma viene mantenuta inferiore rispetto a quella dell'ambiente extracellulare grazie a numerosi meccanismi di controllo, ed aumenta in seguito a stimoli di diversa natura. I recettori con attività tirosino-chinasica e i recettori accoppiati a proteine G promuovono un aumento di Ca^{2+} nel citoplasma attraverso la sintesi di IP₃, che ne induce il rilascio dai depositi intracellulari, le cisterne del reticolo endoplasmatico. I canali del Ca^{2+} ligando-dipendenti e voltaggio-dipendenti presenti in membrana promuovono, invece, l'ingresso di Ca^{2+} nella cellula dall'ambiente extracellulare⁽²¹⁾.

Il più importante recettore intracellulare del Ca^{2+} è la calmodulina (CaM), una proteina ubiquitaria altamente conservata, sensibile alle variazioni di concentrazione del Ca^{2+} di cui media gli effetti all'interno della cellula. La calmodulina è caratterizzata da una peculiare struttura a forma di manubrio, composta da due domini globulari collegati da un connettore centrale. Ognuna delle due porzioni terminali si lega a due ioni calcio. Il connettore tra i due domini globulari che legano il Ca^{2+} è flessibile, e consente alla calmodulina di avvolgersi attorno alle proteine bersaglio in modo caratteristico, con i due domini globulari che le avvolgono da entrambi i lati⁽²²⁾. Il Ca^{2+} si lega alla CaM attraverso un motivo strutturale chiamato "EF hand"; due di questi motivi sono presenti in ciascuna delle estremità globulari della CaM. Quando il Ca^{2+} è legato a tutti e quattro i siti di legame, la calmodulina va incontro ad un cambiamento conformazionale che la attiva e le consente di interagire con le sue proteine bersaglio⁽²²⁾.

La maggior parte degli effetti del complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ è mediata dalle chinasi Ca^{2+} /Calmodulina dipendenti (CaMKs), alle quali esso si lega. Esistono due tipi di CaMKs: quelle specifiche, che fosforilano un unico substrato (CaMKIII) e quelle multifunzionali, cioè capaci di fosforilare diversi substrati (CaMKI, CaMKII e CaMKIV)⁽²¹⁾. Le CaMKs multifunzionali si differenziano in base alla loro localizzazione tissutale e sub-cellulare, all'organizzazione in subunità e alle modalità di attivazione.

CaMKI e CaMKII sono entrambe ubiquitarie, mentre CaMKIV è specificamente espressa in cervello, cellule T, timo, cellule della linea mieloide, testicoli, ovaie e nella ghiandola surrenale.

Dal punto di vista strutturale, le CaMKs presentano un dominio catalitico N-terminale ed una regione regolatoria centrale che contiene il dominio legante la CaM. In assenza di $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, la chinasi risulta stericamente inibita dalla propria regione autoinibitoria, che impedisce sia al substrato che all'ATP di legarsi. Il legame al complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ rimuove l'inibizione sterica ed attiva l'enzima⁽²³⁾. Il passo successivo nell'attivazione è specifico per ciascuna CaMK. Una volta attivata dal legame con il complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, CaMKII si auto-fosforila nel residuo di treonina 286 localizzato in una tasca idrofobica del dominio catalitico. L'autofosforilazione avviene tra due subunità adiacenti nell'oloenzima, e richiede il legame della $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ad entrambe le subunità, la subunità chinasica e la subunità substrato. Questo evento ha due importanti conseguenze: l'affinità dell'enzima per la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ aumenta grazie ad un processo definito "*CaM trapping*" in cui la CaM rimane intrappolata a causa dell'autofosforilazione e tarda a dissociarsi. Il dominio autoinibitorio viene spiazzato, rendendo l'enzima parzialmente indipendente dalla $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Questo comporta che la chinasi rimane attiva anche quando la concentrazione di Ca^{2+} diminuisce e finché la CaM non si dissocia. Questo meccanismo potrebbe servire ad aumentare la sensibilità di CaMKII alle variazioni

della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare. L'attività autonoma di CaMKII è importante soprattutto nei processi neuronali in cui la chinasi è coinvolta, come la LTP (*long term potentiation*) e la LTD (*long term depression*). Il ritorno allo stato inattivo è promosso dalle Fosfatasi 1 e 2 (PP1 e PP2A) che defosforilano il residuo di treonina 286⁽²²⁾. Il meccanismo di attivazione di CaMKII è mostrato nella figura 3.

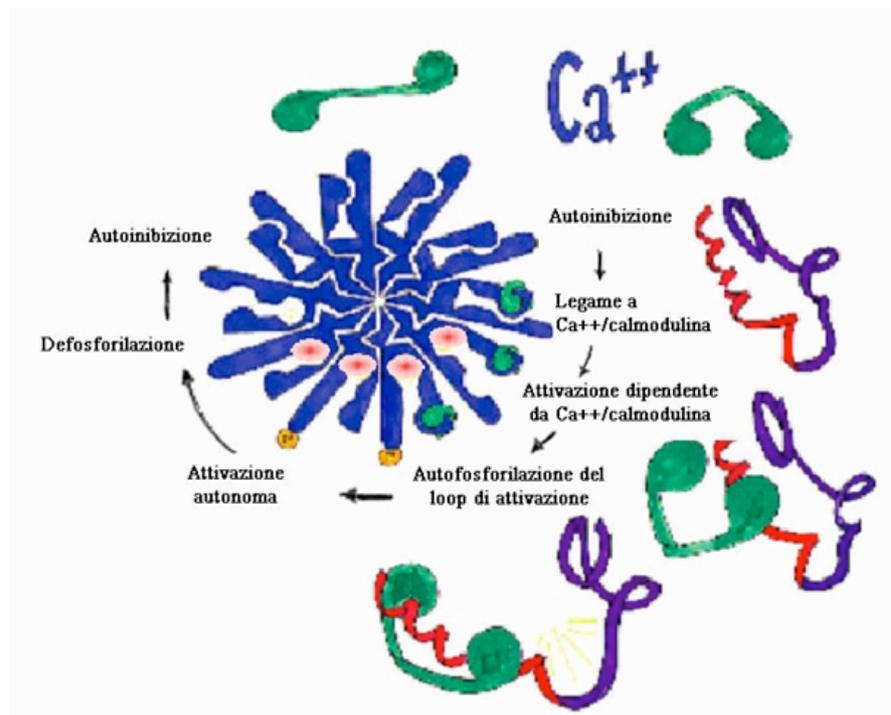


Fig. 3: Rappresentazione schematica del meccanismo di attivazione di CaMKII

Le altre CaMKs multifunzionali, per quanto riguarda le proprietà regolatorie, presentano interessanti similitudini e differenze rispetto a CaMKII. CaMKI e CaMKIV richiedono, per la loro attivazione, la fosforilazione da parte di una chinasi, una *CaM Kinase Kinase* (CaMKK). Ne sono state identificate due isoforme, α e β , che attivano le CaMKs attraverso la fosforilazione di un residuo di treonina situato nel cosiddetto *loop* di attivazione, in modo del tutto simile a quello esercitato da MEK su ERK⁽²³⁾.

CaMKI viene attivata dal legame con la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ma, a differenza di CaMKII e CaMKIV, essa non presenta un'attività autonoma residua. Viene fosforilata in treonina 177, che si trova all'interno del *loop* di attivazione. Questo evento aumenta l'attività enzimatica della chinasi e le conferisce inoltre una maggiore specificità di substrato⁽²¹⁾.

Il meccanismo che porta, invece, all'attivazione di CaMKIV è più complesso e si svolge in almeno tre fasi. Il primo evento è il legame del complesso attivato $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a CaMKIV che espone, così, la treonina 196 nel *loop* di attivazione, conferendo all'enzima un'attività chinasi abbastanza debole che è però sufficiente a determinare il secondo evento di attivazione. Quest'evento consiste nell'autofosforilazione in una serie di residui di serina all'estremità N-terminale della proteina. Infine, la chinasi subisce un'ulteriore fosforilazione da parte di una CaMKK nel residuo di treonina 196 e la sua attività chinasi aumenta ulteriormente. Così attivata, CaMKIV mostra un'attività indipendente dalla $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. L'inattivazione della chinasi avviene ad opera della fosfatasi PP2A.

CaMKIV, a differenza di CaMKII non multimerizza ed esiste in soluzione sotto forma di monomero⁽²³⁾.

Le CaMKs sono coinvolte in molte funzioni fisiologiche, comprendenti il ciclo cellulare, la contrazione della muscolatura liscia, la secrezione e una serie di importanti funzioni neuronali. Esse fosforilano una vasta gamma di substrati e sono implicate nel controllo della trascrizione attraverso l'attivazione di vari fattori di trascrizione.

CaMKII esiste in varie isoforme, espresse in modo differente nei vari tipi cellulari a seconda di quale dei quattro geni codificanti la chinasi venga espresso maggiormente (α , β , γ e λ). Ciascuna isoforma presenta anche delle varianti di *splicing*. Alcune isoforme di CaMKII contengono una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) che interagisce con una proteina chiamata importina, la quale

trasporta l'enzima al nucleo, dove esso agisce da mediatore della trascrizione. È interessante notare che la fosforilazione di CaMKII nella NLS da parte di CaMKI e CaMKIV previene il suo legame con l'importina e la traslocazione nel nucleo.

CaMKI è espressa nel citoplasma delle cellule di mammifero, non presenta delle NLS canoniche e non è ancora chiaro se essa possa traslocare nel nucleo. Tuttavia è stata dimostrata in *Caenorhabditis elegans* l'esistenza di una sua isoforma nucleare, che contiene NLS. CaMKIV, invece, è localizzata sia nel nucleo che nel citoplasma⁽²²⁾.

Uno dei bersagli nucleari più importanti delle CaMKs è la *cAMP response element binding protein* (CREB), un fattore di trascrizione responsabile dell'espressione di geni contenenti il *cAMP response element* (CRE) nel loro promotore. Inizialmente CREB era stato identificato come fattore dipendente dal cAMP, attivato dalla proteina chinasi A (PKA). Studi successivi hanno dimostrato che anche il Ca²⁺ genera segnali in grado di attivare CREB, producendo eventi che coinvolgono le CaMKs. Per l'attivazione di CREB è necessaria una fosforilazione in serina 133 da parte di PKA, che è fondamentale per l'assemblaggio di un complesso trascrizionale multiproteico sul promotore in corrispondenza del CRE. L'elemento centrale di tutto il complesso è la *CREB binding protein* (CBP), un coattivatore trascrizionale importante che presenta attività istone-acetilasi. CaMKIV fosforila CREB nel residuo di serina 133 ed è in grado di indurre la sua attività trascrizionale. CaMKII può fosforilare CREB anche in un sito addizionale, la serina 142, che ha un effetto inibitorio e dominante sull'attività trascrizionale della proteina stessa⁽²⁴⁾. Questo evento potrebbe fungere da inibitore dell'attività di CREB in alcuni tipi cellulari. È stato osservato, inoltre, che la fosforilazione delle isoforme nucleari di CaMKII da parte di CaMKIV blocca l'accesso al nucleo di CaMKII, quindi CaMKIV potrebbe agire da regolatore negativo dell'attività nucleare di CaMKII, agendo sulla sua traslocazione nel nucleo.

Anche CaMKI è in grado di fosforilare CREB sulla serina 133 *in vitro*, ma è improbabile che essa sia in grado di attivare questo fattore trascrizionale in maniera

diretta, visto che una sua localizzazione nucleare non è ancora stata dimostrata in maniera convincente⁽²³⁾. Dal punto di vista funzionale, le CaMKs sono coinvolte nel controllo di una vasta gamma di importanti funzioni biologiche. CaMKIV è espressa in un numero ristretto di tessuti, e le sue funzioni più importanti sono esercitate nell'ambito della neurotrasmissione e del differenziamento. Essa è coinvolta, infatti, nella regolazione di fenomeni neuronali, come la LTP e la LDP, che stanno alla base dell'apprendimento e della memoria⁽²³⁾. Questi fenomeni sono stati studiati soprattutto nell'ippocampo e consistono in variazioni delle risposte sinaptiche in seguito a prolungata stimolazione della sinapsi, variazioni che possono consistere in un potenziamento o in una depressione della risposta che persistono per molto tempo⁽²⁵⁾. CaMKIV esercita una funzione importante anche sui linfociti T, in particolare sul differenziamento e l'attivazione attraverso CREB. L'attivazione delle cellule T, infatti, è un processo a più tappe che comincia con l'attivazione del *T cell Receptor* (TCR) e procede secondo una cascata di eventi intracellulari che terminano con la produzione di citochine e con l'espansione clonale della cellula T attivata. Questo processo richiede l'integrazione di numerose vie di segnale tra cui quelle dipendenti dal complesso Ca^2 / CaM e da PKC, per il coordinamento dell'espressione delle varie citochine, ed in particolare della interleuchina 2 (IL2). La produzione di IL2 richiede l'attivazione di diversi fattori di trascrizione, tra cui *fos* e *jun*, ed è stato ipotizzato che CaMKIV sia responsabile, attraverso CREB, dell'induzione di entrambi i fattori⁽²⁴⁾.

SCOPO DELLA TESI

Per valutare se il *cross-talk* tra il segnale del calcio e quello della via Ras/Erk fosse un meccanismo generale di regolazione della proliferazione o ristretto al sistema delle integrine, abbiamo esteso i nostri studi al segnale insulinico nelle cellule muscolari di ratto L6 trasfettate stabilmente col recettore dell'insulina⁽²⁶⁾.

Dato che la stimolazione del recettore insulinico determina un incremento della concentrazione del calcio intracellulare abbiamo valutato la funzione e l'attività di CaMKII in questo nuovo modello^(27, 28).

L'insulina è un importante fattore di stimolazione della proliferazione in molti sistemi cellulari. Il suo segnale coinvolge diverse chinasi tra cui Ras, PKC e PI3K che inducono l'attivazione di Erk, Akt e dei trasportatori del glucosio⁽²⁹⁾, regolando la proliferazione, la sopravvivenza ed il metabolismo glucidico. Per tale motivo, per la sua molteplicità di effetti e sistemi in cui è presente, abbiamo scelto di studiare il ruolo del calcio e di CaMKII nel meccanismo di stimolazione della proliferazione indotto dall'insulina. L'insulina genera un segnale Ca^{2+} necessario all'attivazione di Erk1/2. Il ruolo giocato dal calcio nel segnale insulinico è stato molto studiato e rimane tuttora in parte ancora poco conosciuto. Evidenze indirette suggeriscono che il calcio è coinvolto nell'azione da parte dell'insulina e che un suo decremento riduce l'*uptake* del glucosio^(30, 31, 32, 33, 34).

Al fine di determinare se CaMKII avesse un ruolo nel modello insulinico è stato necessario:

- Valutare se la stimolazione insulinica nelle celle L6 inducesse aumento della concentrazione intracellulare di calcio.
- Verificare se tale aumento comportasse attivazione di CaMKII.
- Definire il ruolo di CaMKII nelle vie metaboliche attivate dall'insulina.
- Analizzare le funzioni biologiche regolate dall'attivazione di CaMKII.

MATERIALI E METODI

Colture Cellulari.

Le cellule muscolari di ratto L6 venivano coltivate nel mezzo Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (DMEM) (GIBCO UK) a cui veniva aggiunto 10% di siero fetale bovino, 1000U/ml di penicillina, 1mg/ml di streptomicina, 2% di glutamina in un incubatore con 5% di CO₂ ad una temperatura di 37°C.

Western blot e Immunoprecipitazione.

WESTERN BLOT: Le cellule, dopo 3 lavaggi in PBS 1X, venivano lisate in Laemmli (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% glicerolo, 2% SDS, 1% β-mercaptoetanol e 0,006% blu di bromofenolo) e la concentrazione proteica del lisato veniva misurata mediante dosaggio colorimetrico a 750 nm. 80μg di estratto proteico venivano sottoposti a separazione elettroforetica su GEL-SDS di poliacrilammide al 10%. Le proteine venivano trasferite su membrana di nitrocellulosa Immobilion-P (Millipore) e i siti reattivi aspecifici delle membrane venivano saturati con una soluzione al 5% di latte in PBS addizionato con 0,1% di Tween20 (T-PBS) per un'ora in agitazione a temperatura ambiente. Le membrane venivano incubate per un'ora a temperatura ambiente con gli anticorpi specifici. Dopo 3 lavaggi di 15 minuti, i filtri venivano incubati per un'ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi in una diluizione di 1:3000 in T-PBS. Dopo 3 lavaggi di 15 minuti la banda corrispondente alla proteina veniva evidenziata tramite un metodo di chemiluminescenza. Le immagini venivano acquisite mediante scanner e quantificate usando il programma Image Quant (Amersham Biosciences).

IMMUNOPRECIPITAZIONE: Le cellule venivano lisate in un buffer di lisi (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% sodio deossicolato, 0,1% SDS, 10mM NaF, 5mM EGTA, 10mM sodio pirofosfato e 1mM

fenilmetilsulfonil fluoruro). Per immunoprecipitare CaMKII o Raf-1 da 1mg di lisato, venivano usati 1,5 μ l di anticorpo policlonale reattivo verso tutte le isoforme di CaMKII (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e Raf-1 piú 20 μ l di microsferule di agarosio proteina G/proteina A (Oncogene Science, Boston, MA). Gli anticorpi monoclonali verso Erk totale e fosfo-Erk erano della Santa Cruz Biotechnology. Gli anticorpi policlonali anti-fosfoCaMKII (pT286-CaMKII) erano della Promega.

Incorporazione di timidina triziata.

Per la valutare la sintesi del DNA veniva misurata l'incorporazione di timidina triziata in seguito a stimolazione insulinica. 2×10^6 cellule venivano piastrate per ogni pozzetto in piastre multiple da 24 pozzetti, venivano private dal siero e coltivate in DMEM addizionato con 0,5% di BSA (SIGMA) per 48 ore.

Successivamente venivano aggiunte 0,5 μ Ci di timidina triziata ed insulina 100nM. Dopo 24 ore le piastre venivano delicatamente lavate con PBS e poi con 10% di acido tricloro acetico (TCA) e incubate per 10 minuti con TCA 10% a 4°C. Il TCA veniva poi rimosso e le cellule lavate con 0,2% SDS per 15 minuti a 4°C. I lisati venivano risospesi in 5ml di liquido di scintillazione e contati mediante un β -counter.

Saggio di attività di PKC.

L'attività di PKC veniva misurata con un sistema della Promega (Madison, W). Per questo saggio le cellule venivano solubilizzate in un buffer di estrazione (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,5mM EDTA, 0,5mM EGTA, 25 μ g/ml di aprotinina e 25 μ g/ml di leupeptina) e centrifugate a 5000 g per 20 minuti.

Il sovrinatante veniva ulteriormente centrifugato a 6000g per 2 ore, il pellet solubilizzato con il buffer di estrazione a cui era stato aggiunto 0,5% di Triton X-100.

Il pellet solubilizzato veniva immunoprecipitato per 18 ore con gli anticorpi per l'isoforma specifica di PKC e incubato con la proteina A-Sefarosio per 2 ore. A PKC

immunoprecipitata venivano aggiunti gli attivatori del lipide (0,32mg/ml di fosfatidilserina e 0,032mg/ml di diacilglicerolo), e la reazione di fosforilazione veniva innescata aggiungendo la soluzione con il substrato (100nM del peptide neurogranina biotinilato, 0,5mM di ATP, 0,25mM EGTA, 0,4mM di CaCl₂, 0,1mg/ml di albumina di siero bovina, 20mM Tris, pH 7.5, 10mM di MgCl₂, 10μCi/ml (3000Ci/mmol) [γ -³²P]ATP).

La miscela di reazione veniva ulteriormente incubata per 30 minuti a temperatura ambiente e la reazione di fosforilazione veniva terminata aggiungendo idroclorido di guanidina e distribuito su dischi di fosfocellulosa. La radioattività legata al disco veniva quantizzata mediante β -counter.

Saggio di attività di CaMKII.

Le cellule venivano lisate in 200μl di buffer RSB⁽⁴⁴⁾ con 10 mM di CHAPS e l'attività di 20μl di estratto veniva valutato in 50μl di una miscela di reazione contenente 50mM di HEPES pH 7,5, 10mM MgCl₂, 0,5mM di ditiotreitolo (DTT), 2μM CaM, 50μM ATP (1500 cpm/pmol [g³²P]ATP), e 0,1mM del peptide Autocantide II. L'attività totale di CaMK veniva determinata aggiungendo alla miscela 1mM di CaCl₂ mentre l'attività autonoma è stata misurata in presenza di 2,5mM di EGTA. La reazione veniva effettuata per 30 minuti a 30°C ed aliquote di 20μl della mix di reazione venivano adsorbite su filtri di fosfocellulosa p81. (Upstate Biotechnology, Lake placid, NY). La CaM purificata e l'autocantide II sono stati forniti da Dr. AR. Means, Durham, NC. INIBITORI DI CAMKII: L'inibitore farmacologico delle CAMKs, il KN93, è della SIGMA. L'inibitore specifico di CaMKII deriva dall'inibitore endogeno della proteina CaMKIIN ed è reso permeante le cellule mediante l'aggiunta al N terminale di una sequenza derivata dal gene antennapedia (AntCantide).

Saggio di attività di Ras.

L'attività di Ras è stata testata mediante kit (Upstate) che sfrutta la precipitazione per affinità. Le cellule sono state lisate con buffer di lisi (125mM HEPES, pH 7.5, 750mM NaCl, 5% Igepal CA630, 50mM MgCl₂, 5mMEDTA e 10% glicerolo) e incubate con 10μl di *beads* a cui è fissata covalentemente la sequenza peptidica di Raf-1 (RBD) che lega Ras attiva. L'incubazione avviene per 45 minuti a 4°C. Successivamente mediante Western blot e anticorpo monoclonale, anti-Ras, veniva visualizzato Ras associato.

RISULTATI

L'insulina induce la fosforilazione di Erk e di Akt/PKB nelle cellule L6.

Le cellule L6 private dal siero, stimulate con insulina per 15 e 30 minuti, venivano lisate e la fosforilazione di Erk e di Akt veniva valutata mediante Western blot con anticorpi fosfo-specifici.

La stimolazione con insulina induce la fosforilazione sia di Erk che di Akt, per entrambi in maniera dose-dipendente e tempo-dipendente seguendo due curve diverse; infatti, mentre la fosforilazione di Erk risultava massimale dopo 30 minuti di stimolazione, la fosforilazione di Akt si evidenzia a 15 minuti dalla stimolazione per poi tornare dopo 30 minuti ai livelli basali.

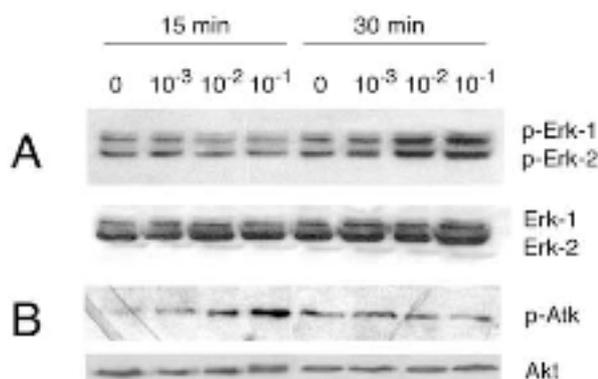


Fig. 4: L'insulina induce la fosforilazione di Erk e di Akt nelle cellule muscolari L6.

Cellule L6 venivano private dal siero e successivamente stimulate con diverse concentrazioni di insulina (1nM, 10nM e 100nM) per 15 e 30 minuti.

La fosforilazione di Erk e di Akt veniva valutata mediante Western blot e anticorpi fosfo-specifici (p-Erk1/2 e p-Akt). A) Erk risultava fosforilata in maniera dose dipendente dopo 30 minuti di stimolazione con insulina. B) La fosforilazione di Akt era evidenziabile già a 15 minuti di stimolazione con insulina tornando però ai livelli basali dopo 30 minuti.

La stimolazione insulinica induce un aumento della concentrazione intracellulare di calcio e l'attivazione della CaMK di tipo II.

Il legame del calcio alla calmodulina (CaM) è un evento necessario all'attivazione delle CaMKs.

Per verificare se l'insulina fosse capace di iniziare la cascata di eventi che porta all'attivazione della CaMKs, veniva misurata la concentrazione intracellulare del calcio nelle cellule L6 in sospensione in risposta alla stimolazione con insulina.

Le cellule L6 venivano private dal siero, successivamente incubate con Fura-2 ed esaminate mediante fluorimetria. L'insulina induceva un graduale aumento della concentrazione intracellulare di calcio che risultava massima dopo 10 minuti di stimolazione (Figura 5A).

CaMKII raggiunge la massima attivazione mediante fosforilazione del suo residuo di treonina in posizione 286. L'analisi mediante Western blot evidenzia una debole banda in corrispondenza alla CaMKII fosforilata in cellule non stimolate. La stimolazione con insulina induceva un aumento della fosforilazione di CaMKII in maniera dose-dipendente (Figura 5B).

È stata poi fatta la misurazione dell'attività chinasi di CaMKII mediante la fosforilazione del suo specifico substrato auto-cattide in vitro (Figura 5C).

CaMKII immunoprecipitata dalle cellule non stimolate mostrava una consistente attività basale; questa attività risultava significativamente aumentata dopo 30 minuti di stimolazione con insulina.

Si può quindi concludere che l'insulina induce un aumento della concentrazione intracellulare di calcio e contemporaneamente attivazione dose-dipendente di CaMKII.

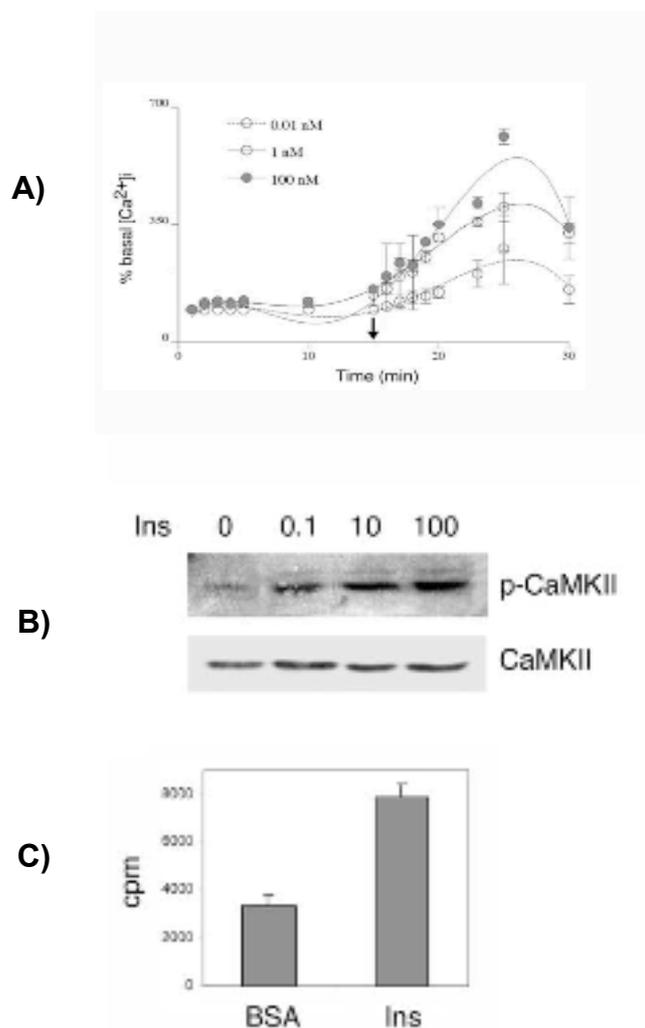


Fig. 5: L'insulina induce un aumento della concentrazione intracellulare di calcio e attivazione dose-dipendente di CaMKII.

Cellule L6 venivano private dal siero, recuperate mediante tripsina ed incubate con Fura-2.

A) Mediante analisi fluorimetrica veniva valutata la concentrazione intracellulare del calcio in risposta a dosi variabili di insulina. L'insulina induce un aumento graduale della concentrazione intracellulare di calcio che risulta massimale dopo 10 minuti di stimolazione.

B) Le cellule L6 private dal siero, venivano stimolate con dosi crescenti di insulina e lisate in RIPA. Gli estratti cellulari venivano risolti su gel SDS-PAGE ed analizzati mediante Western blot con anticorpi specifici per CaMKII totale e per la forma fosforilata di CaMKII che riconosce il residuo p-Thr286 di CaMKII (pCaMKII).

L'insulina induce attivazione dose-dipendente di CaMKII, dimostrando così l'esistenza di una via di segnale calcio-dipendente a valle del suo recettore.

C) L'attività di CaMKII veniva valutata, dopo 30 minuti di stimolazione con insulina 100nM, mediante saggio di fosforilazione su un substrato specifico di CaMKII, l'autocamtide e quantizzazione della radioattività incorporata (cpm) mediante lettura al β -counter.

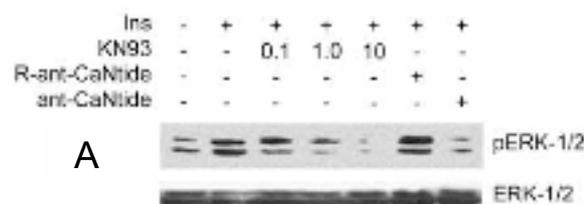
L'inibizione di CaMKII inibisce selettivamente la fosforilazione di Erk stimolata dall'insulina.

Per determinare la possibile esistenza di un cross-talk tra Ca^{2+} /CaMKII e la via di segnale di Erk attivata dall'insulina, come precedentemente dimostrato nel segnale integrinico, ho valutato l'effetto degli inibitori di CaMKII sulla fosforilazione di Erk indotta dall'insulina. Le cellule L6, stimulate con insulina, venivano trattate con gli inibitori di CaMKII, sia quello farmacologico (KN93) che il peptide inibitorio specifico (AntCantide); la fosforilazione di Erk era visualizzata mediante Western blot (Fig. 6A). Con entrambi gli inibitori veniva abolita sia la fosforilazione di Erk indotta dall'insulina che la fosforilazione basale. Questi risultati dimostrano che l'attivazione di Erk da parte dell'insulina richiede che CaMKII sia attiva. Per constatare se il ruolo di CaMKII fosse relegato esclusivamente al pathway Ras/Erk, abbiamo valutato l'attivazione di un altro effettore dell'insulina quale Akt (Fig. 6B).

Le cellule L6 dopo essere state stimulate per 15 minuti con insulina, venivano trattate con gli inibitori di CaMKII (KN93 AntCantide) e i lisati venivano visualizzati mediante Western blot.

L'inibizione di CaMKII non aveva nessun effetto sulla fosforilazione di Akt indotta dall'insulina.

Quest'ultimo risultato dimostra l'interazione selettiva di CaMKII con la via di segnale di Erk generata dall'insulina.



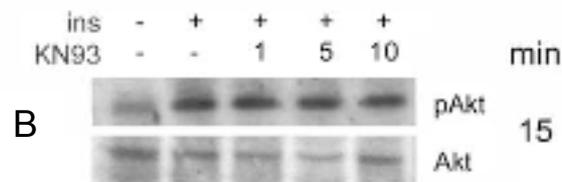


Fig. 6: L'inibizione di CaMKII abroga la fosforilazione di Erk indotta dall'insulina ma non quella di Akt.

Le cellule, private dal siero venivano preincubate per 30 minuti con gli inibitori di CaMKII (KN93 e AntCantide) o con il peptide inattivo di controllo R-AntCantide. Successivamente le cellule erano stimulate con insulina 100nM per 30 minuti e la fosforilazione di Erk veniva visualizzata mediante Western blot ed anticorpo fosfo-specifico.

A)Entrambi gli inibitori determinano una riduzione dose-dipendente della fosforilazione di Erk.

B)Gli inibitori di CaMKII non hanno alcun effetto sulla fosforilazione di Akt indotta dall'insulina indicando che CaMKII non è coinvolta nella regolazione di Akt.

PKC β I è responsabile della fosforilazione di Erk indotta dall'insulina.

Una volta stimolato, il recettore dell'insulina induce l'attivazione del pathway Ras/Erk coinvolgendo diversi fattori come Ras e PKC.

Attraverso la PLC, l'insulina attiva PKC; ne esistono diverse isoforme la cui attività dipende dal calcio e dal DAG: α , β e γ . PKC β è il maggiore fattore di attivazione di Erk coinvolto nel segnale dell'insulina.

Le PKCs possono, a loro volta, attivare Ras e quindi la via proliferativa Raf/Mek/Erk ma possono anche attivare Raf indipendentemente da Ras mediante una via di segnale non ancora ben caratterizzata. In letteratura è riportato che l'insulina è in grado di attivare la fosfolipasi e di stimolare diverse isoforme di PKC^(42, 43), inoltre l'attivazione di PKC β , nelle cellule muscolari scheletriche, svolge un ruolo primario nella sintesi del DNA indipendentemente da Ras e attraverso la via Raf/Mek/Erk.

Per determinare se PKC β e quale delle isoforme di PKC β fosse responsabile della fosforilazione di Erk indotta dall'insulina è stata valutata l'attività della chinasi mediante saggio in vitro (Figura 7A).

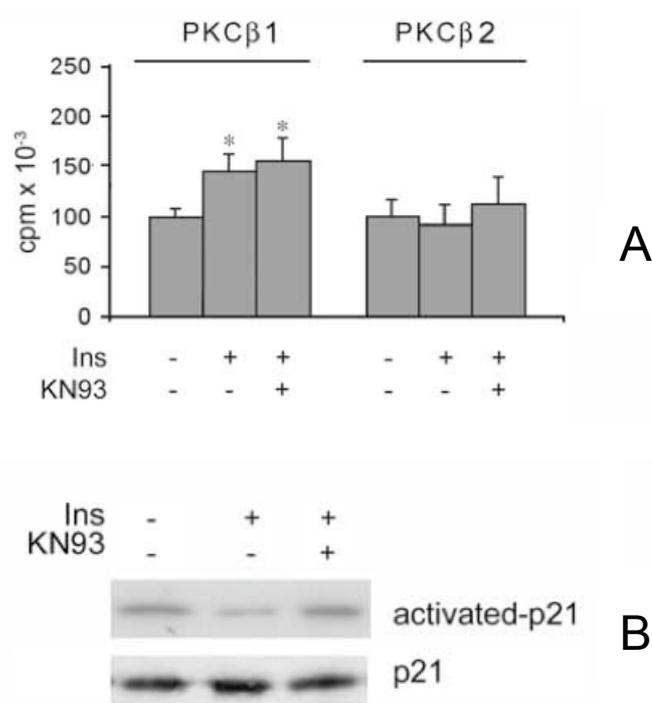


Fig. 7: L'insulina attiva PKCβI ma non attiva né PKCβII né Ras nelle cellule L6.

Per identificare l'isoforma di PKC responsabile dell'attivazione Ras-indipendente di Erk nelle cellule L6 sono state immunoprecipitate PKCβI e PKCβII dagli estratti cellulari ottenuti da cellule L6 stimulate con insulina in presenza o in assenza degli inibitori di strato specifico CaMKII, KN93 o antCantide e ne è stata valutata l'attività su un substrato specifico, la neurogranina.

Per determinare il ruolo di Ras in seguito a stimolo insulinico, le cellule L6 starvate e stimulate con insulina 100nM per 30 minuti venivano lisate; gli estratti cellulari sono stati incubati con le *beads* di agarosio coniugate con la porzione RBD di Raf 1 che lega Ras attivo.

Ras attivo era visualizzato mediante Western blot e anticorpo specifico anti-Ras.

Le cellule L6 private dal siero venivano stimulate con insulina 100nM per 30 minuti; dai lisati cellulari venivano immunoprecipitate entrambe le isoforme PKCβI e PKCβII mediante anticorpi specifici.

L'attività enzimatica di PKCβI aumentava in seguito a stimolazione insulinica mentre l'attività di PKCβII rimaneva invariata dimostrando, quindi, che l'insulina attiva selettivamente PKCβI e l'inibizione di CaMKII non interferisce con questa attivazione.

Successivamente abbiamo verificato il coinvolgimento di Ras in seguito allo stimolo insulinico misurandone l'attività (Figura 7B). Le cellule L6 venivano starvate e stimulate con insulina 100nM per 30 minuti; gli estratti cellulari sono stati incubati

con le *beads* di agarosio coniugate con la porzione RBD di Raf-1 che lega solo Ras attivo.

Ras attivo veniva visualizzato mediante Western blot. Ras risultava parzialmente attivato anche in assenza di insulina e l'inibitore farmacologico di CaMKII (KN93) non aveva nessun effetto sulla sua attività dimostrando, quindi, che, nelle cellule L6, Ras non è responsabile dell'attivazione di Erk indotta dall'insulina. Questi risultati dimostrano che l'attivazione di Erk indotta dall'insulina è mediata da PKC β I in maniera Ras-indipendente.

L'insulina stimola l'associazione di CaMKII e PKC β I con Raf-1.

Dopo aver dimostrato che l'insulina è capace di attivare sia CaMKII che PKC β I, si è voluto determinare il ruolo che queste due chinasi svolgono nell'attivazione di Erk in seguito allo stimolo insulinico.

L'effetto inibitorio dell'antCantide e dell'inibitore generico delle PKC, il BDM, sulla fosforilazione di Erk dimostrava che CaMKII e PKC β I sono entrambi necessari al segnale dell'insulina che induce l'attivazione di Erk. La scelta di Raf-1 come possibile candidato all'interazione tra CaMKII e PKC β I è stata supportata dai dati già presenti in letteratura che riportano Raf-1 capace di legare entrambe le chinasi^(39, 5). Dopo aver stimolato le cellule con insulina, in presenza o in assenza degli inibitori delle CaMKs, veniva immunoprecipitata CaMKII dagli estratti cellulari.

Le proteine immunoprecipitate venivano separate su gel SDS-PAGE e, mediante anticorpo anti-Raf-1, veniva valutata la presenza di Raf-1 legato a CaMKII. In seguito a stimolazione insulinica Raf-1 co-precipitava con CaMKII; la formazione del complesso CaMKII/Raf-1 veniva inibita dagli inibitori di CaMKII (KN93 e antCantide) (Figura 8A).

Parallelamente veniva visualizzato il complesso CaMKII/PKC β I mediante Western blot e anticorpo anti PKC β I. Dai risultati si è visto che in seguito a

stimolazione insulinica anche PKC β I co-precipita con CaMKII e che tale associazione era impedita dagli inibitori di CaMKII (KN93 e antCaNTide) (Figura 8B).

Questi risultati suggeriscono che CaMKII e PKC β I in seguito a stimolazione insulinica si leghino a Raf-1 partecipando così alla formazione di un complesso macromolecolare.

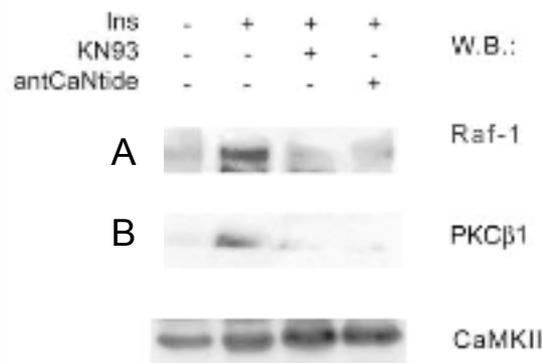


Fig. 8: L'insulina induce l'associazione di CaMKII e PKC β I con Raf-1.

Cellule L6 venivano private dal siero e stimolate con insulina 100nM in presenza e in assenza degli inibitori di CaMKII (KN93 e antCaNTide). **A)** CaMKII veniva immunoprecipitata da 1mg di estratto cellulare ed il complesso CaMKII/Raf-1 veniva visualizzato mediante Western blot con anticorpo specifico anti-Raf-1. In seguito a stimolazione insulinica Raf-1 co-precipitava con CaMKII, mentre entrambi gli inibitori abrogavano completamente tale associazione. Questo risultato dimostra che l'insulina induce la formazione di un complesso proteico tra CaMKII e Raf-1 dipendente dall'attivazione di CaMKII, suggerendo quindi che l'interazione dei segnali Ras/Erk e Ca²⁺/CaMKII si verifichi a livello di Raf-1. **B)** In un esperimento parallelo, dopo aver immunoprecipitato CaMKII, il complesso CaMKII/PKC β I veniva valutato mediante Western blot con anticorpo specifico anti-PKC β I. In seguito a stimolazione insulinica PKC β I co-precipitava con CaMKII mentre sia il KN93 che l'antCaNTide abrogavano completamente tale associazione.

L'inibizione di CaMKII riduce significativamente l'incorporazione di timidina triziata.

È stato già precedentemente dimostrato in altri modelli cellulari che CaMKII è coinvolta nel controllo del ciclo cellulare e della proliferazione⁽⁵⁾. Nel sistema tiroideo CaMKII è necessaria per la proliferazione indotta dalle integrine.

È stata misurata la sintesi del DNA mediante saggio di incorporazione di timidina triziata in seguito a stimolo insulinico e in presenza e in assenza degli inibitori CaMKII (Figura 9).

L'insulina induceva un significativo aumento dell'incorporazione di timidina triziata mentre entrambi gli inibitori di CaMKII (KN93 e antCantide) bloccavano l'incorporazione di timidina indotta dall'insulina. Questi dati dimostrano per la prima volta che CaMKII è coinvolta nella regolazione della proliferazione indotta dall'insulina.

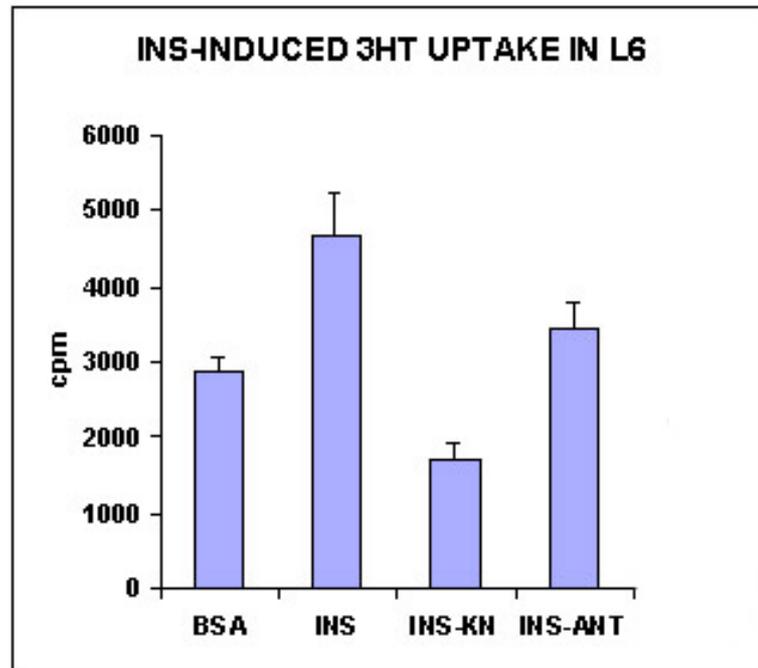


Fig. 9: L'inibizione di CaMKII riduce fortemente l'incorporazione di timidina triziata. Le cellule private dal siero, venivano incubate con 0,5 μ Ci di timidina triziata e 100nM di insulina per 12 ore, in presenza o in assenza degli inibitori di CaMKII. L'incorporazione di timidina triziata veniva valutata mediante β -counter. L'inibizione di CaMKII riduce significativamente l'incorporazione di timidina triziata indotta dall'insulina, suggerendo che CaMKII regoli la sintesi del DNA e quindi la proliferazione cellulare indotta dall'insulina nelle cellule muscolari L6.

DISCUSSIONE

La via di segnale Ras/Erk è un meccanismo di controllo fondamentale presente già negli organismi più semplici; negli eucarioti è implicata in funzioni cellulari importanti quali la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza.

Il suo funzionamento è basato su una serie di fosforilazioni a catena di che si attivano in sequenza: Raf-Mek-Erk fino all'attivazione di fattori trascrizionali^(35,36).

Tra gli stimoli capaci di attivare Erk vi sono le integrine, recettori di membrana presenti in quasi tutte le cellule che riconoscono le componenti della matrice extracellulare (laminina, fibronectina, collagene, vitronectina). Quando legate al substrato, inviano attraverso il domino intracellulare dei segnali che regolano funzioni cellulari fondamentali tra cui la proliferazione, l'organizzazione del citoscheletro, la sopravvivenza e il movimento⁽³⁷⁾.

Le integrine non hanno attività chinasi intrinseca, ma reclutano e attivano delle chinasi tra le quali le *focal adhesion kinase* (FAK), Src, paxillina ed altre⁽³⁸⁾. In tal modo l'attivazione delle integrine avvia un segnale intracellulare multiplo che comprende la modulazione dei livelli di calcio intracellulare, il segnale PI3K/Akt e la via Ras/Raf/Mek/Erk⁽³⁷⁾.

Questi segnali agiscono sia singolarmente che accoppiati, producendo una rete interconnessa di comunicazioni il cui risultato ultimo è la regolazione di fattori trascrizionali.

In un sistema di cellule tiroidee in coltura, due di queste funzioni biologiche, la proliferazione e la sopravvivenza, sono regolate contemporaneamente da due segnali diversi generati dalle integrine. Il segnale PI3K/Akt regola la sopravvivenza della cellula tiroidea, mentre il segnale Ras/Raf/Mek/Erk ne regola la proliferazione. Questi due segnali sono però dissociabili tra di loro grazie ad un terzo segnale sempre originato dalle integrine, che regola l'attivazione di Erk. Questo segnale

regolatorio è costituito dal calcio e da CaMKII. Le integrine attivate inducono un aumento dei livelli di calcio intracellulare e conseguentemente l'attivazione di CaMKII; CaMKII si lega a Raf-1 consentendone l'attivazione.

Le componenti molecolari dei segnali delle integrine ora menzionati sono comuni a molti altri fattori di regolazione delle funzioni cellulari, per cui un'ipotesi plausibile è che il meccanismo di auto controllo del segnale mediato da CaMKII non fosse ristretto alle integrine o alla cellula tiroidea, ma che fosse un meccanismo generale importante anche per altri agenti fondamentali del controllo cellulare quali l'insulina.

Sulla base di tali premesse, l'obiettivo della mia tesi è stato quello di valutare l'estensione di questo meccanismo in altri sistemi cellulari diversi dalla cellula tiroidea e dalla cellula epiteliale e valutarne il ruolo in altri fattori di regolazione cellulare diversi dalle integrine.

L'insulina è tra i fattori di regolazione più importanti delle funzioni cellulari. Il recettore per questo ormone è presente sia in cellule epiteliali che endoteliali e mesoteliali, nelle quali svolge multiple funzioni attraverso diversi segnali.

Ho pertanto scelto questo ormone perchè rappresenta un prototipo di meccanismo di regolazione generale applicabile a molti sistemi cellulari ed a diversi fattori di regolazione delle funzioni cellulari.

La linea cellulare scelta da noi è stata quella delle L6, cellule muscolari lisce di ratto, trasfettate con un vettore di espressione per il recettore umano dell'insulina producendo un modello già caratterizzato in grado di rispondere in modo massimale all'insulina.

L'insulina svolge importanti funzioni tra le quali la proliferazione, modula la sopravvivenza e regola il metabolismo glucidico⁽²³⁾. Queste funzioni sono modulate da segnali in parte comuni ed in parte diversi ma risulterebbero sempre accoppiate tra loro se non vi fosse la possibilità di regolarle ad un livello intermedio selettivo. La

proliferazione indotta dall'insulina è dipendente da Erk. Studi precedenti hanno dimostrato che, a differenza delle integrine, il segnale Raf-1/Mek/Erk viene attivato da PKC β e in maniera ridotta Ras⁽³⁹⁾.

Inibitori di PKC β riducono, infatti, fortemente l'attivazione di Erk indotta dall'insulina, mentre l'inibizione farmacologica di Ras ha solo un effetto minimo. Queste osservazioni dimostrano che PKC β è il principale mediatore dell'insulina nel meccanismo di attivazione di Erk⁽³⁹⁾.

Esistono due isoforme di PKC β : PKC β I e PKC β II. I nostri esperimenti di attivazione del recettore insulinico, accoppiati ai saggi di chinasi hanno dimostrato che l'insulina induce un significativo aumento dell'attività chinasi della PKC β I, mentre il livello di attivazione di PKC β II restava invariato.

Pertanto in questo sistema cellulare l'insulina attiva il segnale IRS/ PKC β I/Raf-1/Mek/Erk.

Valutando la concentrazione intracellulare del calcio, abbiamo osservato che la stimolazione con insulina ne induce un aumento transitorio e significativo. Il calcio intracellulare viene mantenuto ad una concentrazione inferiore a quella dell'ambiente extracellulare grazie ad un sistema di canali regolati da svariati fattori interni ed esterni alla cellula. Una parte del calcio è trattenuta all'interno di compartimenti subcellulari quali il reticolo endoplasmatico, il golgi, i mitocondri e il nucleo. Anche da questi compartimenti il calcio può riversarsi nel citosol e venire prontamente recuperato.

Tra i fattori che regolano l'omeostasi del calcio vi è l'inositolo 3 fosfato (IP3), prodotto dall'azione idrolitica della fosfolipasi C sugli inibitori della membrana cellulare. L'IP3 induce una temporanea mobilitazione del calcio sequestrato nei compartimenti vescicolari avviando un segnale che coinvolge diversi fattori molecolari. Il più importante recettore intracellulare per il calcio è la calmodulina.

Questa piccola proteina ubiquitaria possiede due domini leganti ciascuno 2 ioni calcio e un dominio cerniera intermedio. Il legame di 4 ioni calcio determina un cambiamento della struttura terziaria della calmodulina che, ruotando sul dominio cerniera, ne consente l'interazione con i suoi substrati⁽²¹⁾.

Tra questi substrati vi sono le chinasi calcio-calmodulina dipendenti, le quali vengono attivate solo in presenza di calmodulina legata al calcio.

La CaMKII è una chinasi ubiquitaria calcio-calmodulina dipendente la cui funzione era fino ad ora esclusivamente limitata al sistema neuronale o era coinvolta nei meccanismi di controllo della motilità cellulare. L'osservazione fatta nel sistema tiroideo stimolato dalle integrine ha assegnato alla CaMKII un novo importante ruolo nel controllo di altri segnali, rendendo questa chinasi importante anche nella proliferazione indotta dalla matrice extracellulare nella cellula tiroidea⁽⁵⁾. Gli esperimenti condotti in questa tesi hanno dimostrato che questo ruolo di CaMKII può essere esteso non solo ad altri tipi cellulari, ma anche ad altri meccanismi di controllo dei segnali cellulari.

L'attivazione del recettore dell'insulina nella cellula L6 induce un aumento della concentrazione intracellulare di calcio, seguito da una consistente attivazione di CaMKII endogena. L'attivazione di CaMKII misurata mediante visualizzazione del grado di fosforilazione della chinasi e mediante saggio di attività enzimatica in vitro, è risultato essere fondamentale per la prosecuzione del segnale intracellulare che porta all'attivazione di Erk e quindi alla proliferazione. L'inibizione del sito catalitico di CaMKII mediante un peptide inibitorio (antCaNtide) o l'inibizione dell'attivazione di CaMKII mediante un farmaco in grado di impedire la fosforilazione della chinasi (KN93), blocca completamente l'attivazione di Erk indotta dall'insulina. Importante è l'osservazione che questa azione inibitoria è esclusiva del segnale che porta ad Erk mentre è inefficace sul segnale che porta ad Akt e che pure ha con il precedente

un'origine comune. L'inibizione selettiva della fosforilazione di Erk dimostra che CaMKII agisce a valle di IRS-1/2 e non coinvolge PI3K.

Gli studi condotti sulle cellule tiroidee hanno dimostrato che CaMKII, quando attivata si lega a Raf-1 formando un complesso macromolecolare⁽⁵⁾. Questo legame è necessario affinché Ras sia in grado di attivare Raf-1 e consentire l'attivazione di Erk. Partendo da questa osservazione, ho voluto studiare i possibili rapporti molecolari tra CaMKII e Raf-1 in seguito all'attivazione del recettore insulinico. Tuttavia mentre le integrine attivano il segnale Raf-1/Erk attraverso Ras, l'insulina attiva Erk attraverso PKC β I. Per tale motivo è stata ipotizzata la possibilità di un complesso trimolecolare:

CaMKII/Raf-1/ PKC β I. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione dimostrano che l'insulina induce l'associazione di Raf-1 con CaMKII e che a questo complesso partecipa anche PKC β I.

La sequenza aminoacidica di Raf-1 possiede decine di possibili siti di fosforilazione ed effettivamente numerosissimi sono i residui fosforilati. Tra questi ve ne sono sette che cadono all'interno della sequenza consenso di fosforilazione canonica di CAMKII (R/KXXXS/T). È pertanto possibile che CaMKII si leghi a Raf-1 ad uno di questi sette siti attraverso il suo sito attivo e che fosforili Raf-1.

La fosforilazione di Raf-1 è stata dimostrata in vitro incubando i due componenti purificati in presenza di ATP marcato. Tuttavia questo tipo di esperimento non è conclusivo poiché la fosforilazione potrebbe risultare un artefatto dovuto alla concentrazione non fisiologica dei fattori ottenuti in vitro. Ulteriori esperimenti in cellule in coltura sono necessari per dimostrare se CaMKII fosforila Raf-1 in seguito ad uno stimolo attivante, nonché per identificare quale è il sito fosforilato.

Un'ipotesi formulabile è quella che identifica CaMKII, insieme con PAK, come la chinasi responsabile della fosforilazione del residuo di serina 338 di Raf-1^(40, 41).

Questa serina si trova all'interno di uno dei sette siti compatibili con la sequenza consenso di CaMKII. La fosforilazione di S338 è un evento indispensabile per l'attivazione di Raf-1 e quindi l'inibizione della chinasi responsabile della sua fosforilazione bloccherebbe l'attivazione di Raf-1.

La regolazione selettiva dell'attivazione di Erk indotta dall'insulina è un meccanismo potenzialmente importante per la cellula che può modulare individualmente le funzioni di questo ormone.

La separazione tra lo stimolo proliferativo, quello di sopravvivenza e il controllo glucidico consente alla cellula di modularne uno senza interferire con gli altri. Ad esempio in un organismo adulto la cellula può impiegare l'insulina per promuovere il trasporto del glucosio senza stimolare anche la proliferazione. Questa selezione delle funzioni dell'insulina può avvenire da parte dello stesso recettore insulinico, poiché esso stesso attiva il segnale del calcio.

Diversamente altri fattori possono modulare la concentrazione intracellulare del calcio e di conseguenza l'effetto dell'insulina sul segnale che porta all'attivazione di Erk. Numerosissimi sono i fattori che regolano la concentrazione intracellulare del calcio: ormoni e fattori di crescita, la matrice extracellulare, il pH, altri ioni, la osmolarità, il calcio extracellulare. Pertanto tutti i fattori in grado di regolare la concentrazione intracellulare di calcio potrebbero partecipare agli effetti biologici finali dell'insulina, aumentandoli o inibendoli.

In conclusione la mia tesi dimostra che, in cellule L6, l'insulina attiva diversi segnali, tra i quali quello del calcio e quello che porta all'attivazione di Erk. L'attivazione di Erk è mediata da PKC β I.

L'aumento dei livelli di calcio intracellulare determina l'attivazione di CaMKII. Questa chinasi si lega a Raf-1 formando un complesso trimolecolare CaMKII/Raf-1/PKC β I. L'inibizione di CaMKII blocca in modo selettivo l'azione dell'insulina sul segnale Raf-1/Erk e lo stimolo proliferativi (Figura 10).

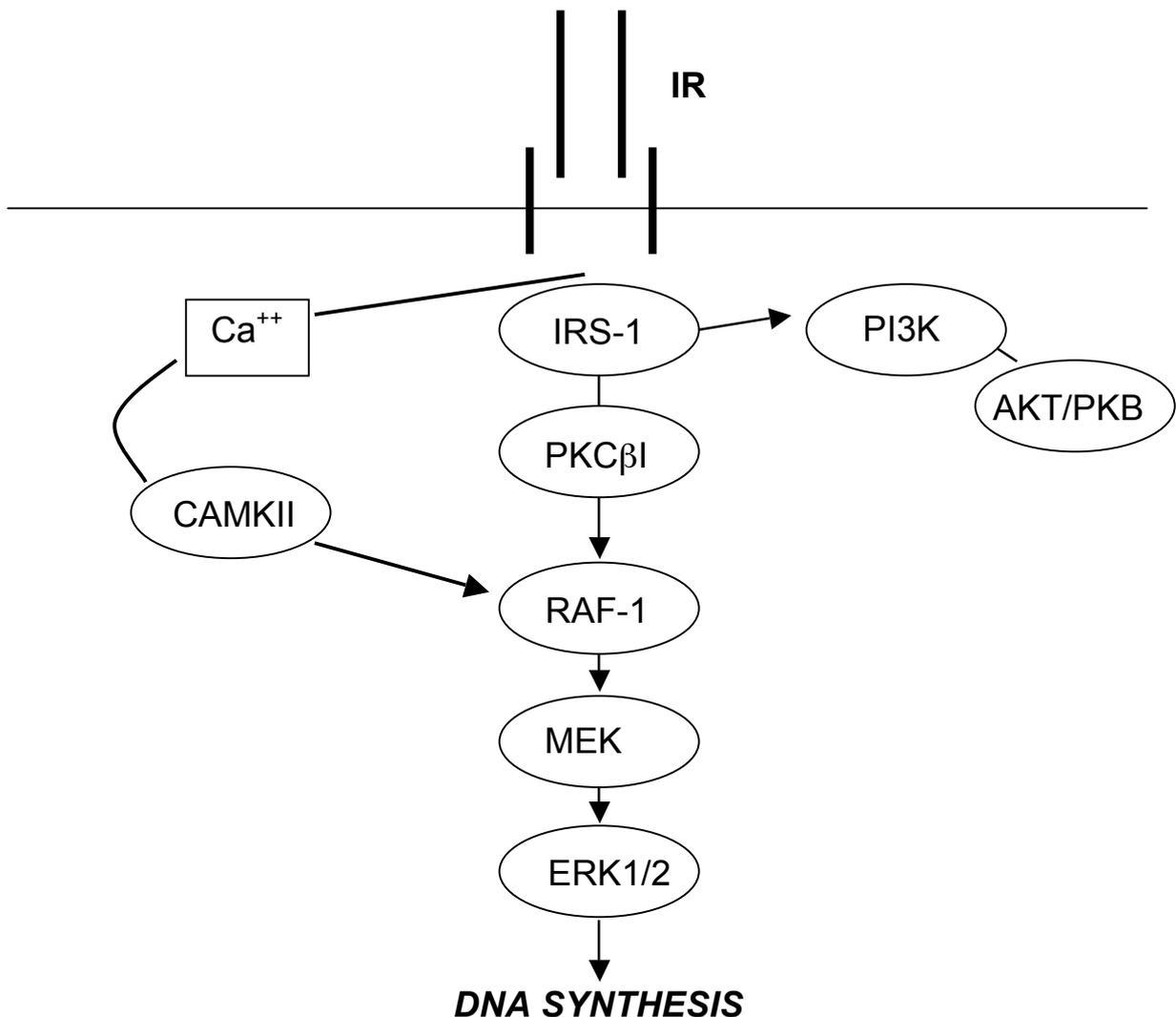


Fig. 10: Attivazione di Erk nel segnale insulinico.

La dimostrazione che CaMKII riveste un ruolo centrale nel controllo dell'attivazione di Erk anche in un sistema cellulare muscolare in seguito a stimolazione insulinica apre un nuovo scenario che vede l'interazione tra due dei principali meccanismi di trasduzione del segnale, ed assegna al calcio e alle chinasi calcio-calmodulina dipendenti un nuovo fondamentale ruolo nel controllo delle funzioni cellulari. L'iperinsulinemia e l'insulino resistenza sono caratteristiche tipiche del diabete mellito non insulina-dipendente, e la proliferazione cellulare incontrollata alla base delle complicazioni a lungo termine del diabete quali la retinopatia ipertensiva. Infatti diverse evidenze, suggeriscono che il calcio sia coinvolto nello sviluppo dell'insulino-resistenza che è una caratteristica del NIDDM

(Diabete mellito di tipo II). Cellule di pazienti con NIDDM presentano elevate concentrazioni di calcio cellulare, aumentata attività di PKC β o entrambe. Queste alterazioni potrebbero generare l'insulino-resistenza ed essere mediate da una variazione della via di segnale Ca²⁺/CaMKII che regola la proliferazione cellulare attraverso l'attivazione di Erk.

BIBLIOGRAFIA

1. Jaconi M.E., Theler J.M., Schlegel W, and Lew P.D. Multiple elevations of cytosolic-free Ca²⁺ in human neutrophils: initiation by adherence receptors of the integrin family. *J Cell Biol.* 1991 Mar; 112(6):1249-57.
2. Kelley GG, Reks SE, Sercka AV. Hormonal regulation of phospholipase Cepsilon through distinct and overlapping pathways involving G12 and Ras family G-proteins. *Biochem J.* 2004 Feb 15;378(Pt 1):129-39.
3. Balnave, C. D., and Allen, D. G. Evidence for Na⁺/Ca²⁺ exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *Am J Physiol.* 1998 Apr;274(4 Pt 1):C940-6.
4. Brautigan, D. L., Kerrick, W. G., and Fischer, E. H. (1980) *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 936-939
5. Illario M, Cavallo AL, Bayer KU, Di Matola T, Fenzi G, Rossi G, and Vitale M. Calcium/calmodulin-dependent preotein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated Erk activation. *J Biol Chem* 278: 45101-45108, 2003
6. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 1994 Dec 22-29;372(6508):786-91.
7. Garrington TP and Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 211-218, 1999.
8. Garrington TP and Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 211-218, 1999.
9. Schlessinger J. Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. [Review] *Cell.* 91(7):869-72, 1997 Dec 26.
10. Kavanaugh WM and Williams LT. An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 266: 1862-1865, 1994.
11. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, and Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252: 668-674, 1991.

12. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, and Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70: 431-442, 1992.
13. Becker EW. Relevance of the kinetic equilibrium of forces to the control of the cell cycle by Ras proteins. *Biol Chem* 385: 41-47, 2004.
14. Cox AD and Der CJ. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22: 8999-9006, 2003.
15. Bondeva T, Balla A, Varnai P, and Balla T. Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *Mol Biol Cell* 13: 2323-2333, 2002.
16. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 1999 Apr 15;18(8):2137-48.
17. King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, Marshall MS. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*. 1998 Nov 12;396(6707):180-3. Erratum in: *Nature* 2000 Jul 27;406(6794):439.
18. Fu H, Xia K, Pallas DC, Cui C, Conroy K, Narsimhan RP, Mamon H, Collier RJ, Roberts TM. Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. *Science* 266: 126-129, 1994
19. Haystead TA, Dent P, Wu J, Haystead CM, Sturgill TW. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Letters*. 306(1):17-22, 1992 Jul 13.
20. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101: 4667-4679, 2003.
21. Hook SS and Means AR. Ca²⁺/CaM-DEPENDENT KINASES: From Activation to Function. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 471-505, 2001.
22. Means AR. Regulatory Cascades Involving Calmodulin-Dependent Protein Kinases. *Mol Endocrinol* 14: 4-13, 2000.
23. Anderson KA, KC. Ca⁺⁺/Calmodulin-dependent proteinkinase IV and Calcium signaling. *BioMetals* 11: 1, 1998.
24. Sun P, EH, Myung PS, Maurer RA. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation
25. R.Paoletti, S.Nicosia, F.Clementi, G.Fumagalli *Farmacologia Molecolare*.

26. Caruso, M., Miele, C., Oriente, F., Maitan, A., Bifulco, G., Androozzi, F., CFormisano, P., and Beguinot, F. (1999) *J Biol Chem* 274, 28637-28644
27. Bruton, J. D., Katz, A., and Westerblad, H. Regulation of myoplasmic Ca(2+) in genetically obese (ob/ob) mouse single skeletal muscle fibres.
28. Pflugers Arch. 2002 Sep;444(6):692-9. Epub 2002 Jun 29. Interactions between effects of W-7, insulin, and hypoxia on glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1994 Oct;267(4 Pt 2):R888-94.
29. Curtis J and Finkbeiner S . Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth. *J Neurosci Res.* 1999 Oct 1;58(1):88-95
30. Pershadsingh, H. A., Gale, R. D., and McDonald, J. M. (1987) *Endocrinology* 121, 1727-1732
31. Youn, J. H., Gulve, E. A., Henriksen, E. J., and Holloszy, J. O. Interactions between effects of W-7, insulin, and hypoxia on glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1994 Oct;267(4 Pt 2):R888-94.
32. Draznin, B., Kao, M., and Sussman, K. E. Insulin and glyburide increase cytosolic free-Ca²⁺ concentration in isolated rat adipocytes. *Diabetes.* 1987 Feb;36(2):174-8.
33. Cheung, J. Y., Constantine, J. M., and Bonventre, J. V. Cytosolic free calcium concentration and glucose transport in isolated cardiac myocytes. . (1987) *Am J Physiol* 252, C163-172
34. Kelly, K. L., Deeney, J. T., and Corkey, B. E. Cytosolic free calcium in adipocytes. Distinct mechanisms of regulation and effects on insulin action. *J Biol Chem.* 1989 Aug 5;264(22):12754-7.
35. Kolch CD, Anderson D, Moran MF, Ellis C, and Pawson T. SH2 and SH3 domains: element that control interaction of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252: 668-674,1991
36. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/Mek/Erk pathway by protein interaction. *Biochem J* 351 Pt2: 289-305, 2000
37. Illario M et al. Integrin- dependent cell growth and survival are mediated by different signals in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 260-269, 2003
38. Schlaepfer DD, Broome MA, and Hunter T. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion Kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 17: 1702-1713, 1997
39. Formisano P, Oriente F, Fiory F, Caruso M, Miele C, Maitan MA, Androozzi F, Vigliotta G, Condorelli G, and Beguinot F. Insulin-activated protein kinase C β

- bypasses Ras and stimulates mitogen-activated protein kinase activity and cell proliferation in muscle cells. *Mol Cell Biol* 20:6323-6333,2000
40. Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, Cobb MH, Marshall MS, Brugge JS. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol*. 2000 May 4;10(9):551-4.
 41. Zang M, Hayne C, Luo Z. Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem*. 2002 Feb 8;277(6):4395-405. Epub 2001 Nov 30.
 42. Kayali AG, Eichorn J, Haruta T, Morris AJ, Nelson JG, Vollenweider P, Olefsky JM, and Webster NJ. Association of the insulin receptor with phospholipase C-gamma in 3T3-L1 adipocytes suggests a role for PLC-gamma in metabolic signaling by insulin. *J Biol Chem* 273: 13808-13818, 1998
 43. Standaert ML, Bandyopadhyay G, Zhou X, Galloway L, and Farese RV. Insulin stimulates phospholipase D-dependent phosphatidylcholine hydrolysis, Rho translocation, de novo phospholipid synthesis, and DAG/protein kinase C signaling in L6 myotubes. *Endocrinology* 137: 3014-3020, 1996
 44. Colomer JM and Means AR. Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol*. 2000 Aug;14(8):1125-36.

PUBBLICAZIONI

Illario M, Cavallo AL, Monaco S, Di Vito E, Mueller F, Marzano LA, Troncione G, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. Fibronectin-induced proliferation in thyroid cells is mediated by α v β 3 integrin through Ras/Raf-1/MEK/ERK and calcium/CaMKII signals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May; **90**(5):2865-73. Epub 2005 Feb 1.

Illario M, Cavallo AL, Bayer KU, Di Matola T, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J Biol Chem.* 2003 Nov 14; **278**(46):45101-8. Epub 2003 Sep 3.

Illario M, Monaco S, Cavallo AL, Fiory F, Formisano P, D'Andrea L, Astone D, Pastore L, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. Calcium-Calmodulin-dependent kinase II participates to insulin-stimulated Erk1/2 activation and modulates proliferation and glucose uptake. *J Biol Chem*, paper in press.