

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
SCIENZE MORFOLOGICHE UMANE E MOLECOLARI

Ciclo XX

Settori scientifico disciplinari di afferenza: BIO 16/BIO17

TITOLO TESI

**Identificazione delle Lamine di tipo A come nuovi
substrati della protein chinasi Akt/PKB**

Presentata da: Bertacchini Jessika

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Cocco Lucio

Prof.ssa Marmioli Sandra

Esame finale anno 2008

INDICE

ABBREVIAZIONI	4
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	8
FOSFORILAZIONE PROTEICA	8
<u>Akt/PKB:</u>	
• Struttura e generalita'	13
• Regolazione	
<u>Attivazione</u>	16
- Attivazione tramite fosfoinositidi D3	16
- Attivazione tramite fosforilazione e ruolo del dominio PH	19
<u>Inibizione</u>	25
- Controllo dell'attivita': ruolo delle fosfatasi lipidiche e proteiche	25
• Akt e partner di legame	28
• Akt e il nucleo	31
• Funzioni fisiologiche	35
- Akt, una proteinchinasi di sopravvivenza	37
- Akt e sopravvivenza attraverso la regolazione della trascrizione	40
- Akt e sopravvivenza attraverso la fosforilazione diretta di proteine pro-apoptotiche	44
• Controllo della progressione del ciclo cellulare	47
• Ruolo di Akt nel metabolismo cellulare	52
<u>Le Lamine</u>	56

OBIETTIVO DELLA RICERCA	61
MODELLO SPERIMENTALE	63
MATERIALI E METODI	66
RISULTATI	78
DISCUSSIONE	110
BIBLIOGRAFIA	118

ABBREVIAZIONI

[γ - ³² P] ATP	ATP marcato con fosforo radioattivo nel fosfato γ
Akt-NLS	Akt con sequenza di localizzazione nucleare
BSA	Siero albumina bovina
DMEM	Dulbecco 's modified Eagle's medium
DTT	Dititreitolo
FBS	Siero bovino fetale
FHS	Siero fetale di cavallo
GEF	fattori di scambio guanosinici
IP	Immunoprecipitato
LMNA	Lamine di tipo A
PBS	Soluzione tampone fosfato
PDK1	phosphoinosite-dependent kinase 1
PI 3-chinasi o PI 3-K	fosfoinositide 3-chinasi
PI	fosfatidilinositolo
PVDF	polivinildenfluoruro
SDS	Sodio dodecil fosfato
SDS-PAGE	Elettroforesi su ge di poliacrilammide in SDS
TBS	Soluzione tampone Tris
Tris	tris (idrossimetil) aminometano
WB	Western blot
PIP3	fosfatidilinositolo (3, 4, 5) trisfosfato
PIP2	fosfatidilinositolo (3, 4) bisfosfato

ABSTRACT

Akt (also called PKB) is a 63 kDa serine/threonine kinase involved in promotion of cell survival, proliferation and metabolic responses downstream the phosphoinositide-3-kinase (PI 3-kinase) signaling pathway. In resting cells, Akt is a predominantly cytosolic enzyme; however generation of PI 3-kinase lipid products recruits Akt to the plasma membrane, resulting in a conformational change which confers full enzymatic activity through the phosphorylation of the membrane-bound protein at two residues, Thr308, and Ser473.

Activated Akt redistributes to cytoplasm and nucleus, where phosphorylation of specific substrates occurs.

Both the presence and the activity of Akt in the nucleus have been described. An interesting mechanism that mediates nuclear translocation of Akt has been described in human mature T-cell leukemia: the product of TCL1 gene, Tcl1, interacts with the PH domain of phosphorylated Akt, thus driving Akt to the nucleus. In this context, Tcl1 may act as a direct transporter of Akt or may contribute to the formation of a complex that promotes the transport of active Akt to the nucleus, where it can phosphorylate nuclear substrates. A well described nuclear substrate is Foxo. IGF-1 triggers phosphorylation of Foxo by Akt inside the nucleus, where phospho-Foxo associates to 14.3.3 proteins that, in turn, promote its export to the cytoplasm where it is sequestered. Remarkably, Foxo phosphorylation by Akt has been shown to be a crucial

event in Akt-dependent myogenesis. However, most Akt nuclear substrates have so far remained elusive, as well as nuclear Akt functions. This lack of information prompted us to undertake a search of substrates of Akt in the nucleus, by the combined use of 2D-separation/mass spectrometry and anti-Akt-phosphosubstrate antibody. This study presents evidence of A-type lamins as novel nuclear substrates of Akt. Lamins are type V intermediate filaments proteins found in the nucleus of higher eukaryotes where, together with lamin-binding proteins, they form the lamina at the nuclear envelope, providing mechanical stability for the nuclear membrane.

By coimmunoprecipitation, it is demonstrated here that endogenous lamin A and Akt interact, and that A-type lamins are phosphorylated by Akt both in vitro and in vivo. Moreover, by phosphoaminoacid analysis and mutagenesis, it is further demonstrated that Akt phosphorylates lamin A at Ser404, and, more importantly, that while lamin A/C phosphorylation is stable throughout the cell cycle, phosphorylation of the precursor prelamin A becomes detectable as cells enter the G2 phase, peaking at G2/M. This study also shows that lamin phosphorylation by Akt creates a binding site for 14.3.3 adaptors which, in turn, promote prelamin A degradation. While this mechanism is in agreement with a general role of Akt in the regulation of a subset of its substrates, opposite to what has been described, degradation is not mediated through a ubiquitination and proteasomal mechanism but through a lysosomal

pathway, as indicated by the reverting action of the lysosomal inhibitor cloroquine.

Phosphorylation is a key event in the mitotic breakdown of the nuclear lamina. However, the kinases and the precise sites of phosphorylation are scarcely known. Therefore, these results represent an important breakthrough in this very significant but understudied area. The phosphorylation of the precursor protein prelamin A and its subsequent degradation at G2/M, when both the nuclear envelop and the nuclear lamina disassemble, can be view as part of a mechanism to dispose off the precursor that is not needed in this precise context.

The recently reported finding that patients affected by Emery-Dreifuss muscular dystrophy carry a mutation at Arg 401, in the Akt phosphorylation motif, open new perspective that warrant further investigation in this very important field.

INTRODUZIONE

LA FOSFORILAZIONE PROTEICA

La fosforilazione delle proteine è una modificazione post-traduzionale semplice e reversibile, che regola la maggior parte delle funzioni cellulari. Si tratta di una modificazione covalente a carico di gruppi alcolici di residui aminoacidici quali serina o treonina, o di gruppi fenolici di residui di tirosina; prevede il trasferimento verso questi substrati di γ -fosfato da una molecola di donatore, che può essere l'ATP o, più raramente, il GTP. Le proteinchinasi, cioè gli enzimi che catalizzano queste reazioni, sono una famiglia di proteine, che conta oltre cinquecento membri, tra le più grandi codificate dal genoma umano. È infatti stato calcolato che circa il 2% del genoma umano sia rappresentato da geni di proteinchinasi.

Le proteinchinasi traducono gli stimoli in eventi biochimici e svolgono ruoli a tutti i livelli delle vie di trasduzione del segnale, dalla membrana cellulare al nucleo.

Dal punto di vista strutturale, le proteinchinasi presentano un dominio catalitico molto conservato, costituito da circa 250-300 residui (Hanks e Quinn, 1991). Grazie al numero crescente di proteinchinasi conosciute, è stato possibile generare alberi filogenetici, che hanno permesso di classificare i vari membri di questa superfamiglia (Hanks e Hunter, 1995) (Fig. 1).

Esistono quattro famiglie principali:

- 1) il gruppo AGC, che include le famiglie PKC, PKA e PKG, la famiglia dei recettori chinasi β -adrenergici e delle chinasi ribosomiali S6;
- 2) il gruppo delle chinasi Ca^{++} /calmodulina dipendenti;
- 3) il gruppo CMGC, che include la famiglia delle chinasi ciclina-dipendenti, la famiglia Erk e la famiglia delle glicogeno sintasi chinasi 3;

Tutte le proteinchinasi elencate nei primi tre gruppi sono Ser/Thr chinasi, cioè' in grado di fosforilare in modo specifico residui di serina o treonina.

- 4) Il gruppo delle Tyr chinasi, che catalizzano il trasferimento di γ -fosfato ad un residuo di tirosina.

La fosforilazione proteica è un meccanismo dominante nel trasferimento dei segnali all'interno della cellula, poiché consente di controllare le proteine modificandone l'attività enzimatica, la localizzazione intracellulare, la stabilità e permette di creare o bloccare siti di legame per altre proteine. (Per comprendere l'importanza e la pleiotropicità del meccanismo di fosforilazione basti pensare che un organismo pluricellulare semplice come *Caenorhabditis elegans* possiede circa 400 geni, una parte molto significativa del suo genoma, che codificano per proteinchinasi).

Perciò la nostra conoscenza dei meccanismi molecolari della fisiologia cellulare non può prescindere dalla conoscenza dei substrati bersaglio delle specifiche chinasi. Purtroppo, l'identificazione dei substrati rilevanti in ogni particolare momento biologico si è dimostrata difficile, lenta e spesso

inaffidabile, ed e' rimasta significativamente indietro rispetto alla conoscenza dei meccanismi di regolazione delle chinasi. Recentemente pero', il lavoro svolto a partire dalla meta' degli anni novanta soprattutto nei laboratori di LC Cantley, HMS, Boston, e di T. Pawson, MSH, Montreal, basato sull'utilizzo di una libreria peptidica orientata, con elevato grado di degenerazione, ha permesso di definire il motivo di fosforilazione di molte chinasi. Tale conoscenza e' alla base della recente produzione di anticorpi in grado di riconoscere motivi fosforilati da specifiche chinasi, di fosfo-microarray, di kit per l'arricchimento di fosfoproteine, che ha dato grande impulso a questo campo di ricerca. Sono ormai numerosi i laboratori che si occupano di identificare substrati specifici delle diverse chinasi. In particolare, per quanto riguarda la chinasi Akt, sono stati pubblicati negli ultimi anni risultati di estremo interesse per la comunita' scientifica, che hanno permesso di includere tra i substrati fisiologici di Akt proteine chiave di diversi crocevia cellulari come BAD, la caspasi 9, Foxo, TSC, GSK3, PRS40, p21^{WAF1} e molti altri (tabella 1). Una migliore comprensione del ruolo fisiologico di Akt attraverso l'identificazione dei suoi substrati fisiologici ha rappresentato percio' l'obiettivo generale di questo studio.

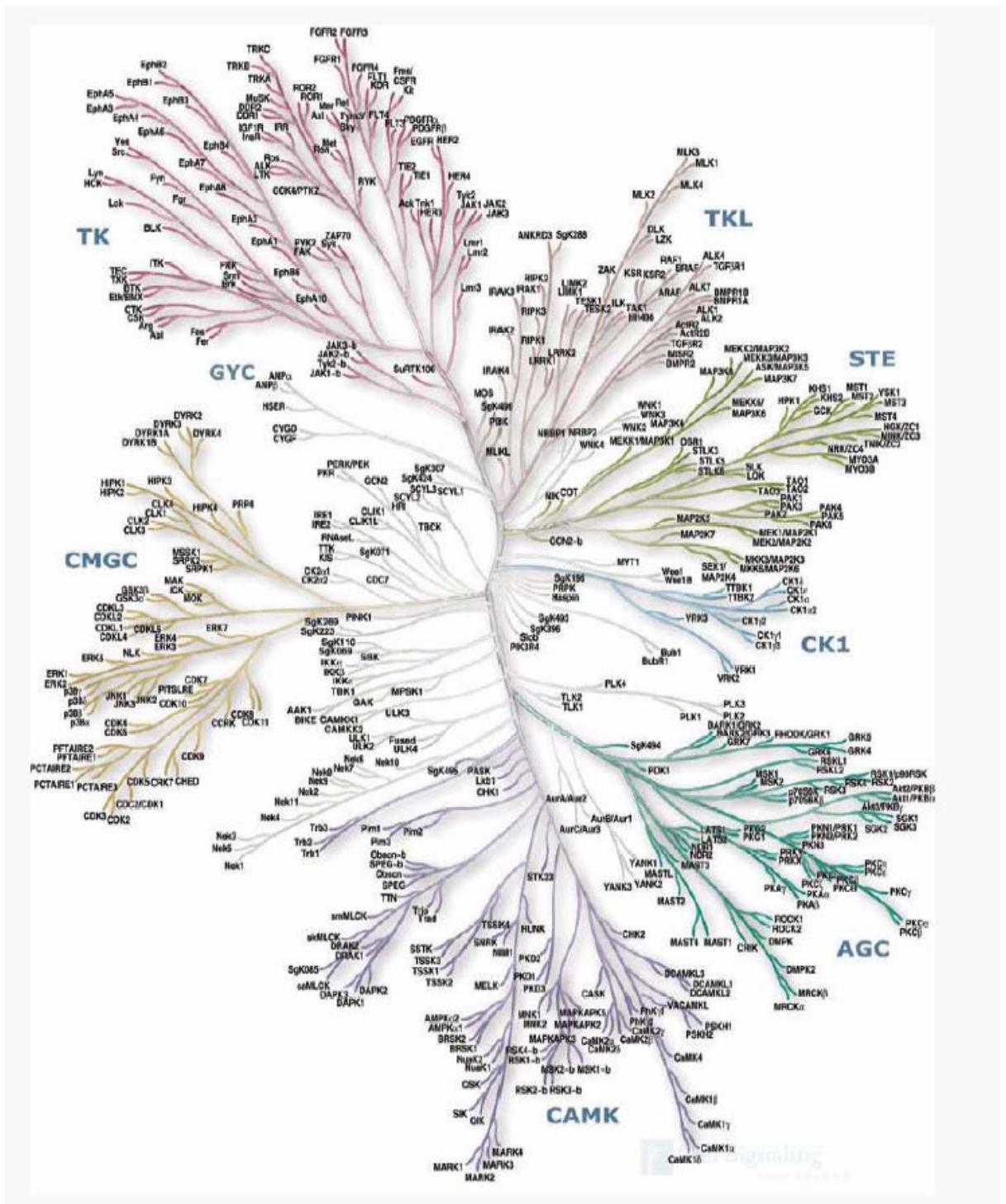


FIG 1: The kinase complement of the Human Genome

G. Manning, D. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam “The AGC Kinase Complement of the Human Genome” *Science*, 2002

Table 1. Characteristics and Experimental Evidence for a Subset of Akt Substrates^a

Target	Human Site(s) ^b	In Vitro ^c	In Vivo ^d			Genetic Evidence ^e	Regulatory Effect? ^f
			W/L	LOF	GOF		
FOXO1	T24, S256, S319	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
FOXO3A	T32, S253, S315	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
FOXO4	T32, S197, S262	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
TSC2	S939, T1462	+	+	+	+	M, F	Inhibit
GSK3 α/β	S21/S9	+	+	+	+	M	Inhibit
RAF1	S259	+	+	+	+	-	Inhibit
PRAS40	T246	+	+	-	+	M	Inhibit
AS160	S588, T642	+	+	-	-	-	Inhibit
BAD	S99	+	+	+	+	-	Inhibit
WNK1	T60	+	+	+	-	M	?
MDM2	S166, S186	+	+	+	+	-	Activate
Chk1	S280	+	+	+	+	M	Inhibit
eNOS	S1177	+	+	+	+	M	Activate
ASK1	S83	+	+	+	+	-	Inhibit
IKK α	T23	+	-	-	-	-	Activate
p21CIP1	T145	+	+	+	+	-	Inhibit
p27KIP1	T157	+	+	+	+	-	Inhibit
Casp9	S196	+	-	+	+	-	Inhibit

^aFor an expanded version of this table see Table S1.

^bHuman numbering of sites with strongest evidence of being phosphorylated by Akt in vivo.

^cDirect phosphorylation of the given site(s) with purified Akt and full-length substrate in vitro.

^dEvidence of Akt-dependent phosphorylation of the given site(s) within cells (- means no published evidence), including: W/L, sensitivity to PI3K inhibition using ≤ 100 nM wortmannin (W) and/or ≤ 20 μ M LY294002 (L); LOF, loss-of-AKT-function evidence using dominant-negative mutants and/or RNAi approaches; GOF, gain-of-Akt-function evidence using overexpression and/or constitutively active mutants.

^eGenetic evidence in model organisms, including epistasis analyses in *Drosophila* (F) or *C. elegans* (W) or loss-of-phosphorylation

Tabella 1: Physiological Akt/PKB substrates

Brendan D Manning, Lewis C Cantley

AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream.

Cell. 2007 Jun 29;129 (7):1261-74 17604717

Akt/PKB

STRUTTURA E GENERALITA'

Akt/PKB (da qui in poi chiamata semplicemente Akt) è una serina/treonina chinasi, nota anche come "**RAC**" (Related to A and C kinases) o "**PKB**" per l'omologia del suo dominio catalitico con quello della PKA e delle PKC (Bellacosa et al., 1991, Coffer et al., 1991). Essa è stata inizialmente identificata come il prodotto dell'oncogene v-Akt, isolato da un retrovirus AKT 8 (Franke et al., 1997; Chan et al., 1999).

Esistono tre isoforme conosciute di Akt, cioè Akt-1, Akt-2 e Akt-3; questa famiglia di serina/treonina chinasi è conservata nell'ambito di tutti gli eucarioti (Hill MM et al., 2002).

Nel topo, la distribuzione delle isoforme Akt 1 e Akt 2 e' ubiquitaria, mentre l'isoforma Akt 3 e' prevalentemente espressa nel cervello e nei testicoli.

La struttura della proteina e' caratterizzata da un dominio PH N-terminale, un dominio chinamico centrale e un dominio regolatorio C-terminale. Il dominio PH (plekstrin homology domain) consiste di circa 100 aa, ed e' stato originariamente identificato nella proteina Plekstrin, il substrato piu' fosforilato da parte di PKC, nelle piastrine. Tale dominio e' in grado di interagire con i fosfoinositidi prodotti dalla chinasi lipidica fosfoinositide 3-chinasi (PI 3-chinasi), fosfatidilinositolo (3, 4, 5) trisfosfato (PIP3) e

fosfatidilinositolo (3, 4) bisfosfato (PIP2) (Hanada et al., 2004).

Il dominio chinasi è localizzato nella porzione centrale della molecola e mostra un'elevata analogia con quello presente nelle altre proteinchinasi della famiglia AGC.

Tutte e tre le isoforme di Akt hanno un'estensione C-terminale di circa 40 aminoacidi; contenente il motivo idrofobico, caratteristico della famiglia delle AGC chinasi, la cui fosforilazione è necessaria per la completa attivazione enzimatica (Alessi et al., 1996).

Inizialmente fu constatato che l'attività di Akt era stimolata da diversi ormoni, citochine e fattori di crescita, quali PDGF, EGF, NGF, insulina; tale attività era al contrario inibita in presenza di inibitori specifici della PI 3-chinasi, quali wortmannina, oppure dominanti negativi della PI 3-chinasi stessa (Chan et al., 1999).

Tali risultati indicavano chiaramente una dipendenza dell'attività di Akt dai fosfoinositidi D3 prodotti dalla PI 3-chinasi; la scoperta che mutazioni del dominio PH di Akt ne bloccavano la funzionalità (Franke et al., 1997; Stokoe et al., 1997) ha permesso di ipotizzare un'interazione diretta tra il dominio PH e i fosfoinositidi D3, facendo intraprendere gli studi che hanno condotto alle evidenze descritte nella sezione seguente.

Fig 2 Akt1,2,3/PKB α , β , γ Structure

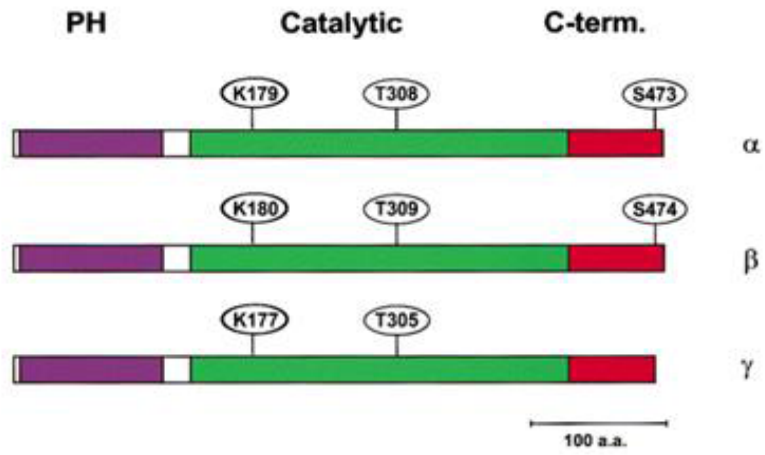
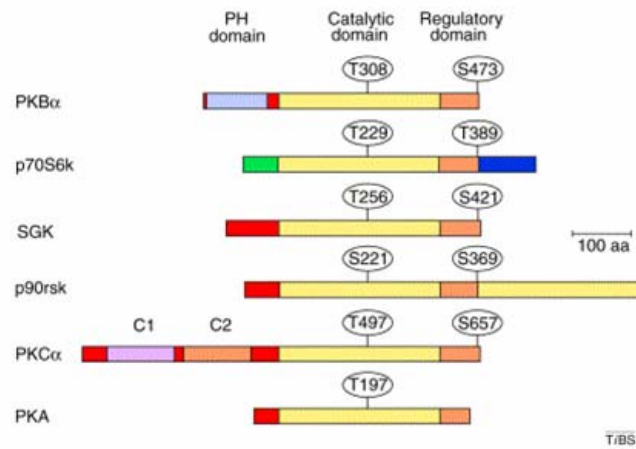


Fig 3 Akt and AGC Kinases



REGOLAZIONE

ATTIVAZIONE

Attivazione tramite fosfoinositidi D3

I fosfoinositidi D3 (PI-D3) sono il prodotto dell'azione della chinasi lipidica fosfoinositide 3-chinasi (PI 3-chinasi o PI 3-K), che fosforila in posizione 3' l'anello del fosfatidilinositolo (PI), un componente minore dei lipidi presenti nella plasmamembrana (<10%). Sono substrato dell'enzima anche molecole di PI già fosforilate (in posizioni dell'anello diverse dal 3'), quali il PI(4)P, il PI(4,5)P₂ e il PI(5)P (Chan et al., 1999; Brazil et al., 2004).

I fosfoinositidi D3 sono in grado di modulare l'attività delle loro proteine bersaglio legandosi ad esse, a livello di un preciso segmento di circa cento amminoacidi, denominato dominio **PH**, ove PH sta per "Pleckstrin Homology".

Tale dominio è in grado anche di legare le subunità $\beta\gamma$ di proteine G attivate, avvalorando quindi l'ipotesi di un'attivazione dei peptidi contenenti il dominio PH mediata appunto dalle subunità $\beta\gamma$.

Attualmente tale dominio è stato identificato in numerose proteine che agiscono a valle della cascata di segnali innescata dalla PI 3-chinasi: ad esempio la chinasi phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), i fattori di scambio guanosinici (GEF), diverse isoforme di protein-chinasi C, oltre alla

serina\treonina chinasi Akt (Chan et al., 1999).

L'interazione diretta tra i fosfoinositidi e il dominio PH di Akt è stata dimostrata da numerosi studi provenienti da laboratori diversi (Franke et al., 1997; Stokoe et al., 1997). Questi studi hanno infatti dimostrato che l'iper-espressione di forme costitutivamente attive della subunità catalitica della PI 3-chinasi di classe Ia attiva Akt sia in cellule di mammifero che di insetto, e che i fosfoinositidi inducono l'attività di Akt dopo essersi legati ad essa a livello della sua porzione PH.

In particolare, il dominio PH si lega stabilmente al PI(3,4)P₂ e al PI(3,4,5)P₃ *in vitro*, mentre si associa debolmente al PI(4,5)P₂, stabilendo così che tale legame è stereospecifico per i fosfoinositidi D3, in quanto il PI(3)P e il PI(3,5)P₂ non hanno questa caratteristica (Franke et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1999).

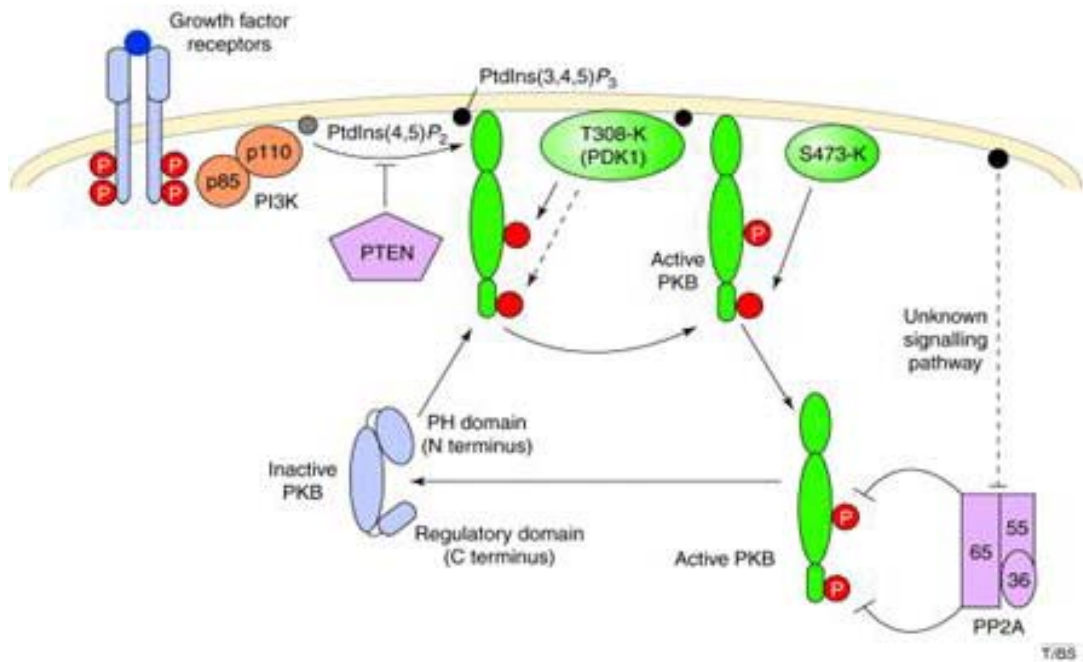


Fig 4 Proposed model for PKB/Akt regulation by receptor tyrosine kinases.

Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA

Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts

Trends Biochem Sci. 2004 29 :233-42.

ATTIVAZIONE TRAMITE FOSFORILAZIONE E RUOLO DEL

DOMINIO PH

L'attivazione di Akt non dipende unicamente dal suo legame con i fosfoinositidi D3. E' stato infatti stabilito che l'attivazione di Akt da parte di fattori di crescita è conseguenza anche di una serie di fosforilazioni su residui specifici (Alessi et al., 1997; Toker et al., 2000; Persad et al., 2001). Inoltre, l'attivazione di Akt, da parte di segnali di stress o tramite la stimolazione di recettori accoppiati a proteine G, è dipendente da fosforilazione, ma indipendente dalla PI 3-chinasi.

Quattro sono i siti di fosforilazione identificati: in cellule non stimolate e mantenute in assenza di siero, la chinasi è costitutivamente fosforilata su due residui: serina 124 (Ser124) e treonina 450 (Thr450); il primo residuo si trova a valle del dominio PH, il secondo si trova nella coda carbossi-terminale della proteina. Le fosforilazioni della Ser124 e della Thr450 non sembrano strettamente necessarie per l'attivazione della chinasi, seppure vi contribuiscono: infatti, la stimolazione con fattori di crescita di forme di Akt, in cui questi due residui sono stati mutati, si traduce in una riduzione dell'attività della proteina, senza peraltro abolirla.

La successione degli eventi che portano all'attivazione di Akt, in seguito alla stimolazione con fattori di crescita, è stata oggetto di studi che hanno portato alla presentazione di un modello di attivazione a tre stadi (Chan et al., 1999). Il

primo stadio è dato dalla fosforilazione del residuo Thr450 di Akt; sebbene la fosforilazione di tale amminoacido non sembri un prerequisito fondamentale per gli eventi a seguire, potrebbe però rappresentare un riferimento utile al ripiegamento della proteina. Quest'ultimo evento segna la fine del primo stadio nel modello.

Il secondo stadio è rappresentato dalla traslocazione di Akt in membrana. Infatti, in cellule a riposo la proteina è localizzata prevalentemente nel citosol in forma inattiva. La produzione di fosfoinositidi D3 da parte della PI-3 chinasi in risposta a stimoli fisiologici agisce da esca per traslocare l'enzima in prossimità della membrana plasmatica. Il legame del dominio PH ai fosfoinositidi D3 ancora l'enzima alla membrana plasmatica e probabilmente produce una modificazione conformazionale che libera il loop attivatorio della subunità catalitica, come illustrato di seguito.

Il terzo stadio prevede infine una duplice fosforilazione, sui residui Thr308, nel loop di attivazione, e Ser473, nel dominio idrofobico C-terminale.

La fosforilazione su Thr 308 attiva la proteina solo parzialmente e la predispone alla successiva fosforilazione della Ser 473, che invece sembra completare l'attivazione (Frödin et al., 2002; Yang et al., 2002).

Thr308 - La Thr308 viene fosforilata dalla chinasi fosfoinositide-dipendente PDK-1, una serin/treonin chinasi di 63 kDa, contenente un dominio PH, che si lega con elevata affinità ai fosfoinositidi D3. Pertanto, la produzione localizzata di fosfoinositidi D3 ha la duplice funzione di co-localizzare Akt e

PDK-1, favorendo la fosforilazione su Thr308.

Dominio PH - Il dominio PH di Akt è di primaria importanza nell' attivazione della proteina da parte di PDK-1. Ricerche a tale proposito hanno riportato le seguenti evidenze sperimentali:

-La fosforilazione *in vitro* di Akt wild type avviene solo in presenza di fosfoinositidi D3.

-Gli stessi fosfoinositidi D3 non sono in grado di stimolare la fosforilazione, da parte di PDK-1, di Akt recante mutazioni a livello del dominio PH.

-Per contro, la delezione del dominio PH permette al mutante Akt Δ PH di essere fosforilato da PDK1 anche in assenza di fosfoinositidi.

Tali risultati indicano che il dominio PH ha un effetto regolatorio negativo sulla fosforilazione di Akt, che viene rimosso quando si instaura il legame tra il dominio PH e i fosfoinositidi D3, evento che comporta una modificazione conformazionale di Akt con conseguente esposizione dei siti di fosforilazione.

Il ruolo del dominio PH nell'attivazione di Akt e' stato studiato mimando l'ancoraggio in membrana della proteina attraverso l'espressione di forme di Akt modificate per aggiunta del segnale di miristoilazione CaaX all'estremita' N-terminale. Questa modificazione consente alla proteina, espressa in cellule in coltura, di essere prontamente modificata per aggiunta di una catena di acido grasso al residuo di cisteina, e quindi di ancorarsi alla membrana in modo reversibile, mimando cosi' l'effetto che si ottiene in condizioni

fisiologiche in seguito alla produzione di PI(3,4,5)P₃ nella membrana. Questo ha permesso di identificare molte delle funzioni fisiologiche di Akt, e di stabilire che la traslocazione alla membrana plasmatica di Akt, PDK1 e altre proteine, coinvolte in modo accessorio in seguito all'attivazione della PI-3K, è dunque assolutamente dipendente dalla presenza del dominio PH nella struttura di tali proteine.

Ser473 - La fosforilazione del residuo Ser 473 e' in grado di stabilizzare il sito attivo nella sua conformazione attiva, favorendo l'interazione del motivo idrofobico con il sito di legame per l'ATP (Frödin et al., 2002; Yang et al., 2002), inoltre facilita la fosforilazione del residuo Thr308 da parte di PDK-1 (Sarbasov et al., 2005; Bayascas et al., 2005). La proteinchinasi responsabile di questa fosforilazione e' stata oggetto di studio e controversie per anni. Una delle prime ipotesi prese in considerazione e' stata che questa fosforilazione avvenga attraverso un meccanismo di autofosforilazione (Toker et al., 2000). Questa ipotesi e' stata smentita da studi in cellule che non esprimevano PDK1. In questo modello cellulare, benché in presenza di una proteinchinasi Akt scarsamente attiva, perché non fosforilata sul residuo Thr308, la fosforilazione a livello della Ser473 non era diminuita, suggerendo l'intervento di una chinasi diversa sia dalla stessa Akt che da PDK1 (Williams et al., 2000; Hill et al., 2001).

Proteinchinasi che potrebbero giocare un ruolo in questo evento, almeno in alcuni tipi cellulari, sono la integrin-linked kinase (ILK), la PKC β II e la DNA-dependent protein kinase (DN-PK).

Per quanto riguarda la proteina ILK, e' stata considerata per un certo tempo come il miglior candidato per la fosforilazione della Ser473, vista la sua capacita' di fosforilarla *in vitro* (Delcommenne et al., 1998). Studi successivi hanno pero' messo in evidenza che ILK e' in grado di favorire la fosforilazione della Ser473, piu' che di operarla direttamente (Lynch et al., 1999).

Anche la PKC β II e' in grado di fosforilare Akt a livello della Ser473 sia *in vitro* che *in vivo*, in seguito a stimolazione con esteri del forbolo (Kawakami et al., 2004). Tuttavia non e' stato completamente chiarito se questa fosforilazione e' diretta o indiretta.

Per quanto concerne il ruolo di DNA-PK, e' stato recentemente osservato che il suo knockdown per mezzo di RNA interferenti provoca una drastica riduzione dello stato di fosforilazione della Ser473, in cellule di glioblastoma (Feng et al., 2004). Tuttavia, topi knockout per il gene della DNA-PK non presentano alterazione nell'attivita' catalitica di Akt (Gao et al., 1998). Anche in questo caso, quindi, i risultati non sono conclusivi.

Tra le proteinchinasi prese in considerazione, figura anche mTOR (mammalian target of rapamycin), in quanto e' noto che questa proteinchinasi, associata a formare il complesso denominato mTORC1 con RAPTOR

(regulatory associated protein of mTOR) e GβL (G-protein β subunit like), e' la chinasi che, in condizioni fisiologiche, fosforila un residuo di serina nel motivo idrofobico di un altro membro della famiglia delle proteinchinasi AGC, la proteinchinasi p70S6 (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002).

E' stata percio' ipotizzata, in un primo momento, l'esistenza di una unica chinasi in grado di fosforilare diversi membri della famiglia AGC e quindi anche Akt, nel motivo idrofobico, in analogia con quanto osservato a livello del loop di attivazione delle chinasi AGC da parte di PDK1 (Mora et al., 2004). Questa ipotesi fu successivamente scartata in seguito alla mancata inibizione della fosforilazione di Ser473 di Akt da parte del farmaco immunosoppressore rapamicina, potente inibitore di mTOR. Recentemente, Sabatini e colleghi (Sarbasov et al., 2005) hanno invece dimostrato l'esistenza di un secondo complesso di mTOR (mTORC2), comprendente un nuovo partner insensibile alla rapamicina, RICTOR (rapamycin insensitive companion of mTOR), oltre a GβL. Il complesso mTORC2, insensibile alla rapamicina, e' in grado di fosforilare Akt a livello della Ser473 *in vitro*. *In vivo*, inoltre, RNA interferenti specifici per mTOR o per RICTOR fanno diminuire sensibilmente la fosforilazione della Ser473 sia in cellule di mammifero che in *Drosophila*. Questi dati sperimentali hanno quindi finalmente permesso, dopo anni di ricerche, di dare un'identita' alla "Ser473 chinasi".

INIBIZIONE

CONTROLLO DELL'ATTIVITA': RUOLO DELLE FOSFATASI

LIPIDICHE E PROTEICHE

Lo stato di attivazione di Akt *in vivo* dipende, come nella maggior parte delle vie di trasduzione del segnale, dal bilancio dei segnali attivatori e dei segnali inibitori. I primi operano, come già descritto, sia indirettamente, attraverso la produzione di PIP3, sia direttamente, attraverso la fosforilazione diretta dei residui T308 e S473. I segnali inibitori, a loro volta, portano all'inattivazione di Akt ad opera di fosfatasi che, ancora una volta, agiscono sia indirettamente, regolando la fosforilazione del PIP3, sia direttamente, regolando la fosforilazione della proteina stessa. Il livello di PI(3,4,5)P₃ prodotto da PI 3-chinasi è finemente regolato grazie all'azione di fosfatasi lipidiche, in particolare PTEN, che defosforila il PI(3,4,5)P₃ in posizione 3'-OH (Stambolic et al., 1998), e SHIP, che defosforila il PI(3,4,5)P₃ in posizione 5'-OH (Rohrschneider et al., 2000). Va però sottolineato che, mentre l'azione di PTEN si traduce in una drastica riduzione dell'attività di Akt, non si può dire altrettanto per SHIP. Questa osservazione ha trovato una spiegazione solo recentemente, quando è stato ottenuto il cristallo del dominio PH di Akt. Infatti, questo ha permesso di verificare la presenza di una tasca in grado di accogliere il residuo 3'-OH del PIP3, ma non il 5'-OH, che di conseguenza non influenza l'attività della proteina.

Inoltre, la regolazione dell'attività di Akt dipende anche dal mantenimento del suo stato fosforilato, e in questo contesto svolgono un ruolo importante due proteinfosfatasi: PP2A (Andjelkovic et al., 1996) e PHLPP (PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase). La fosfatasi PP2A defosforila il residuo Thr308. Di una certa importanza, in questo processo, è l'interazione di Akt con il complesso HSP90/cdc37, che sembra svolgere in questo caso un ruolo protettivo, prevenendo l'azione della PP2A sulla Thr308 e mantenendo quindi Akt in uno stato attivo (Sato et al., 2000).

Le fosfatasi PHLPP1/2, che defosforilano il residuo Ser473, sono state identificate solo recentemente (Gao et al., 2005; Brognard et al., 2007). Sono note due isoforme, che sembrano defosforilare in modo selettivo la Ser473 delle diverse isoforme di Akt. In particolare, PHLPP1 gioca un ruolo nel metabolismo del glucosio, in cui Akt2 è la isoforma protagonista, mentre PHLPP2 agisce sulle vie di segnale di sopravvivenza cellulare, in cui Akt1 sembra avere il ruolo centrale (Brognard et al., 2007).

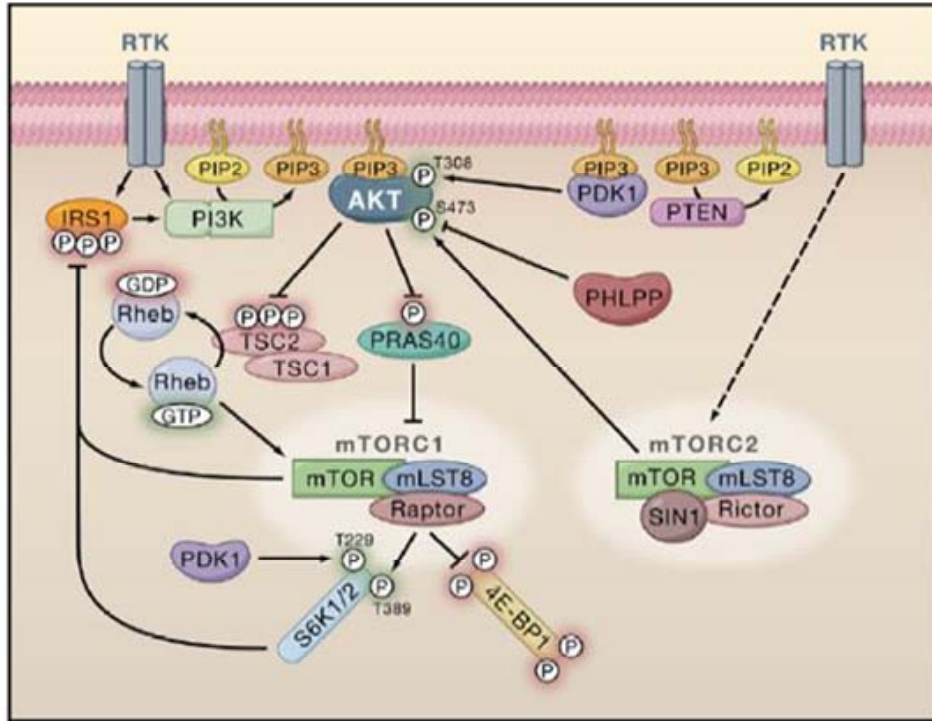


Fig 5 Upstream activation of Akt by growth factors

Manning BD, Cantley LC.

AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell. 2007 129 :1261-74.

AKT E PARTNER DI LEGAME

Nello scenario descritto, l'associazione dei 3'-fosfoinositidi al dominio PH e la fosforilazione gerarchica di Akt in Ser473 e Thr308 sembrano l'unico dispositivo che scatena l'attivazione di Akt, e quindi la fosforilazione dei suoi substrati. Tuttavia, ulteriori molecole sono state coinvolte in questo processo, suggerendo che un meccanismo ben più complesso ed integrato possa guidare l'attivazione di Akt. Infatti, sono stati recentemente identificati diversi partner di segnale di Akt, che si comportano come regolatori, piuttosto che come substrati, e definiti perciò non-substrati (Brazil et al., 2004). L'interazione con proteine non-substrato può influire sull'attività chinasi di Akt, come dimostrato nell'associazione con CTMP, Hsp90/Cdc37, Hsp27, Btk, Tcl1 (Brazil et al., 2004, Noguchi et al., 2007) and Src kinase (Tabella 2). Per esempio, è stato osservato che in cellule HEK293 Akt interagisce con la proteina Tcl1, una piccola proteina di 14 kDa prodotto dell'oncogene Tcl1, dando origine al complesso di alto peso molecolare Tcl1-Akt (Noguchi et al., 2007) in grado di stimolare sia la fosforilazione che l'attività di Akt. Inoltre, recenti osservazioni indicano che la tirosina chinasi Src può legare Akt con una interazione diretta tra il suo dominio SH3 ed il dominio ricco di proline (PXXP) della regione regolatrice C-terminale di Akt. Ancora, è stata recentemente identificata una nuova forma di PIKE, chiamata PIKE-A, che in presenza di GTP lega specificamente Akt attivo, ma non PI 3-K, stimolandone

l'attività chinasi. L'interazione PIKE-A/Akt è mediata dal dominio GTPasico di PIKE-A e dal dominio regolatore C-terminale e da una porzione del dominio catalitico di Akt. L'overespressione della forma wild type di PIKE-A aumenta l'attività di Akt, mentre l'overespressione della forma dominante negativa di PIKE-A o il suo knockdown inibiscono Akt (Van den Heuvel et al., 2002).

D'altra parte, è stato dimostrato che l'interazione con proteine non-substrato regola anche la localizzazione intracellulare di Akt, come nel caso di TCL1, Keratin 10, Grb10,

periplakin, actin (Brazil et al., 2004, Cenni et al., 2003) and PIKE-A, favorendo la costituzione di vie di segnale localizzate. In particolare, l'interazione con alcuni di questi ligandi, che sembra essere importante per l'attività di Akt tanto quanto per la sua distribuzione intracellulare, è mediata dal dominio PH di Akt. In questo senso, è stato dimostrato che Tcl1 e la periplachina, quest'ultima un membro della famiglia di cytolinkers plachina, legano il dominio PH di Akt e agiscono come segnali di localizzazione di Akt, aiutando la redistribuzione di Akt verso la sua destinazione finale.

Recentemente, è stato anche dimostrato che Akt può interagire con l'actina direttamente, sia in vitro che in vivo, attraverso il suo dominio PH (Cenni et al., 2003). Di particolare rilievo è la dimostrazione che la proporzione tra actina legata e non legata ad Akt non è costante, ma è modulata da fattori di crescita quali PDGF e IGF1. La fosforilazione di Akt sembra essere un

requisito fondamentale per il suo legame all'actina, suggerendo che il legame con l'actina sia modulato in risposta a specifici segnali per permetterne la redistribuzione all'interno della cellula in seguito alla attivazione. Si può perciò ipotizzare che il dominio PH sia utile ad Akt per l'espletamento di due processi distinti: i) favorirne l'interazione con la membrana e la fosforilazione in seguito all'arrivo di stimoli; ii) mediarne l'interazione con partner di segnale successivamente al suo rilascio dalla membrana nella conformazione fosforilata ed attiva.

Binding proteins	Biological significance	Endogenous interaction	Refs
Actin	Localization of PKB/Akt to the cytoskeleton: cdc42 is also involved	Yes	[48]
Periplakin	Binds to the PH domain of PKB/Akt and mediates localization to the intracellular network	Yes	[47]
TRB3	Blocks PKB/Akt activation in hepatocytes	Yes	[46]
CTMP	Binds to the C-terminus of PKB/Akt and blocks phosphorylation and activation	Yes	[45]
JIP1	PKB α /Akt1 binding blocks JNK binding to JIP1 and delays apoptosis	No	[23]
POSH	PKB β /Akt2 binding blocks MLK-MKK-JNK complex formation and apoptosis	No	[24]
ERK1/2	PKB/Akt binds a complex of ERK1/2, Rsk and PDK1 to regulate apoptosis	Yes	[78]

Tabella 2 Partner di legame per Akt/PKB

Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA
Trends Biochem Sci. 2004 29: 233-42.

AKT E IL NUCLEO

In seguito al trattamento con fattori di crescita, Akt si distribuisce nel citoplasma e trasloca nel nucleo. In particolare, uno studio recente ha consentito di seguire la fosforilazione di substrati reporter di Akt, coniugati a sonde fluorescenti, in tempo reale in vivo, e quindi di monitorare indirettamente la traslocazione di Akt attivo al nucleo (Kunkel et al., 2005). Questo approccio ha dimostrato che il segnale di attivazione chinasi nel nucleo insorge con un ritardo di circa 20 minuti rispetto al citoplasma, ritardo compatibile con il tempo necessario per la traslocazione della proteina attiva, nel modello cellulare e con lo stimolo testati, ma è molto più stabile rispetto a quello citoplasmatico .

Tra i substrati di Akt, identificati nel nucleo, sono stati descritti i fattori di trascrizione della famiglia “forkhead”. I membri finora identificati di questa famiglia, FKHR, FKHL1, AFX contengono tutti la sequenza consenso di fosforilazione canonica di Akt (Brunet et al., 1999).

In assenza di attivazione di Akt, le proteine forkhead risiedono prevalentemente nel nucleo, dove promuovono la trascrizione di geni pro-apoptotici come Fas-L, IGFBP1, and Bim (Nicholson et al., 2002). La fosforilazione di FKHL1 da parte di Akt ne determina la fuoriuscita dal nucleo e il sequestro da parte delle proteine 14-3-3 con conseguente accumulo nel citoplasma. A conferma di queste osservazioni, altre evidenze dimostrano

che mutanti non fosforilabili di FKHL1 non vengono esportati dal nucleo. Studi recenti su AFX indicano che la sua fosforilazione avviene principalmente nel nucleo. Sia Akt1 che Akt2 sono in grado di migrare nel nucleo in situazioni adeguate come stimolazione con siero (Andjelkovic et al., 1997), attivazione di linfociti B (Astoul et al., 1999), coma ipoglicemico (Ouyang et al., 2000), stimolazione mitogenica con IGF-1 o PDGF (Bavelloni et al., 1999; Borgatti et al., 2000) e trattamenti differenziativi con NGF (Salinas et al., 2000). In particolare, IGF-1 promuove la fosforilazione di FKHL1 mediata da Akt. Per esempio, sembra che durante il differenziamento muscolare, Akt2, ma non Akt1, sia localizzato nel nucleo, e più efficiente nell'attivazione dell'espressione di geni muscolo-specifici. Inoltre, anticorpi contro Akt2, ma non contro Akt1, bloccano il differenziamento muscolare, suggerendo che Akt2 svolge un ruolo cruciale nel differenziamento dei mioblasti che non può essere vicariato da Akt1. Un interessante meccanismo che media la traslocazione nucleare di Akt è quello, descritto nel paragrafo precedente, operato dal prodotto del gene TCL1, Tcl1, che, oltre ad aumentare l'attività e la fosforilazione di Akt, attraverso un'interazione con il dominio PH di Akt1, ne guida anche traslocazione al nucleo. In questo contesto, Tcl1 sembra agire come un trasportatore diretto di Akt o contribuire alla formazione di un complesso che promuove il trasporto nucleare di Akt. Mentre sono note numerose proteine con funzione di controllo di Akt nel citoplasma, la sua regolazione nel nucleo non è stata caratterizzata. In questo

contesto, va evidenziato che sia la PI 3-K che i suoi prodotti PI3,4,5P3 and PI3,4P2, gli attivatori fisiologici di Akt, sono presenti nel nucleo (Martelli et al., 2004). Inoltre, anche la chinasi regolatrice di Akt, PDK1 e' stata recentemente descritto nel nucleo. Inoltre, considerata la localizzazione sia citosolica che nucleare di PIKE-A, anche questa proteina potrebbe funzionare da regolatore fisiologico di Akt nel nucleo, oltre che nel citoplasma. Percio', e' ipotizzabile che, in determinate circostanze, Akt possa essere attivato direttamente nel nucleo.

A

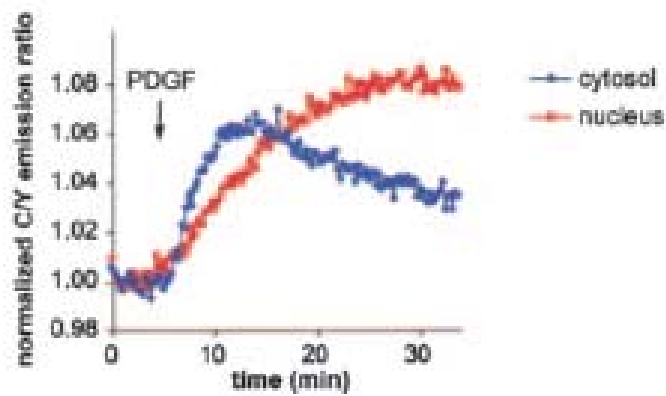


Fig 6 Analisi dell' attivazione di Akt nel citosol e nel nucleo

Dopo stimolazione con PDGF, la fosforilazione di Akt nel citosol aumenta molto rapidamente per poi tornare al livello basale dopo soli 10 minuti dal trattamento. Al contrario, l'attività di Akt nel nucleo aumenta con andamento lineare, raggiunge livelli maggiori rispetto all'attività della chinasi nel citosol, ed è stabile anche dopo 30 minuti dalla stimolazione

Kunkel et al., J Biol Chem. 2005 280 : 5581-7.

FUNZIONI FISILOGICHE

In seguito alla sua attivazione, e quindi successivamente al suo distacco dalla membrana, Akt fosforila numerose proteine localizzate sia nel citoplasma che nel nucleo. Il numero di substrati fisiologici di Akt e' in crescente aumento. L'identificazione dei potenziali substrati di Akt e' stata favorita da studi che hanno portato alla definizione di una sequenza peptidica minima richiesta per mediare la fosforilazione Akt-dipendente (Arg-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-[Ser/Thr]-Hyd, dove Xaa e' un piccolo amminoacido e Hyd e' un residuo idrofobico come fenilalanina o leucina) (Alessi et al., 1996). Uno studio condotto sulle proteine presenti nel database di Swissprot ha permesso di identificare questa sequenza 551 volte in 446 proteine. Non bisogna escludere la possibilita' che *in vivo* altre condizioni non prevedibili, come un'organizzazione strutturale di grado superiore in cui giace la sequenza consenso, siano richieste per favorire l'interazione tra chinasi e substrato. Anche la localizzazione subcellulare dei substrati e' molto importante. In cellule non stimolate, la maggior parte di Akt risiede nel citosol. L'attivazione di PI 3-K induce la migrazione di Akt in membrana a cui fa seguito una rapida redistribuzione di Akt nel citoplasma cellulare (Andjelković et al., 1997; Meier et al., 1997). Una

massiccia attivazione di Akt promuove anche la sua traslocazione al nucleo, dove si trovano altri substrati.

AKT, UNA PROTEINCHINASI DI SOPRAVVIVENZA

APOPTOSI. L'apoptosi è un programma di morte cellulare ben delineato nelle sue caratteristiche morfologiche. Infatti, durante questo processo si osserva la contrazione della cellula, la formazione di vescicole di membrana plasmatica e la condensazione della cromatina. Diversamente dalla necrosi, nell'apoptosi non si ha rilascio di materiale cellulare, quindi non viene indotta una risposta infiammatoria. Al termine del processo si formano i corpi apoptotici, riconosciuti e rapidamente fagocitati dai macrofagi o dalle cellule circostanti (Willie et al., 1993). Un ruolo predominante nel meccanismo apoptotico è svolto da una famiglia di cistein proteasi omologhe, altamente conservate nei processi evolutivi (Fan et al., 2005), denominate caspasi (cysteine-directed aspartate-specific protease). Esse operano un taglio in corrispondenza del legame tra un residuo di aspartato e un residuo aminoacidico, in pochi e ben precisi substrati. In alcuni casi, questo porta all'attivazione del substrato, mentre in altri porta alla sua attivazione per rimozione di una subunità inibitrice. Esempio di questo meccanismo è l'attivazione delle stesse caspasi, prodotte come zimogeni inattivi e attivate a cascata per reciproca digestione parziale in corrispondenza di un modulo presente nel prodominio. Il processo apoptotico può essere scatenato da segnali extracellulari (via estrinseca o recettoriale) oppure dall'attivazione di un processo interno alla cellula (via intrinseca). La prima via è mediata da

recettori che rispondono a segnali extracellulari, i cosiddetti recettori di morte, della famiglia TNF-RI (tumor necrosis factor receptor I), che in seguito ad attivazione formano oligomeri. Gli oligomeri, tramite l'intervento di proteine adattatrici quali FAD (Fas-associated Death Domain) e TRADD (TNF receptor I Associated Death Domain), formano il complesso proteico DISC (Death Inducing Signalling Complex) che recluta diverse molecole di pro-caspasi 8. Queste, trovandosi a stretto contatto, si attivano reciprocamente con formazione di caspasi 8, che agisce attivando le caspasi 2 e 10 ed è detta perciò caspasi "iniziatrice". L'attivazione del processo apoptotico da parte del sistema di sorveglianza intrinseco alla cellula, invece, consegue a eventi intracellulari, come danni al DNA. In questo caso, un ruolo fondamentale è svolto da organuli subcellulari quali il mitocondrio e il reticolo endoplasmatico, la cui integrità è regolata da fattori pro-apoptotici, tra cui membri della famiglia Bcl-2. Benché non sia noto l'esatto meccanismo molecolare, è probabile che Bcl-2 sia in grado di inserirsi nella membrana mitocondriale esterna formandovi un canale, oppure di attirare in membrana altre proteine in grado di formare dei pori nella stessa, oppure ancora di alterare l'equilibrio osmotico del mitocondrio, che andrebbe perciò incontro a rigonfiamento e lisi. In tutti i casi, il risultato è l'uscita di proteine mitocondriali quali il citocromo c, che interagisce con Apaf1 (apoptosis protease activating factor) e con pro-caspasi 9, formando il cosiddetto

“apoptosoma”. In tal modo la caspasi 9 viene attivata e puo’ a sua volta attivare la caspasi 3, che andra’ infine ad agire sui suoi substrati apoptotici.

Come descritto di seguito, Akt svolge un ruolo di fattore di sopravvivenza agendo su diverse proteine chiave sia della via intrinseca che di quella estrinseca, operando sia con un meccanismo diretto (fosforilazione del substrato) che con un meccanismo indiretto (regolazione dell’espressione genica).

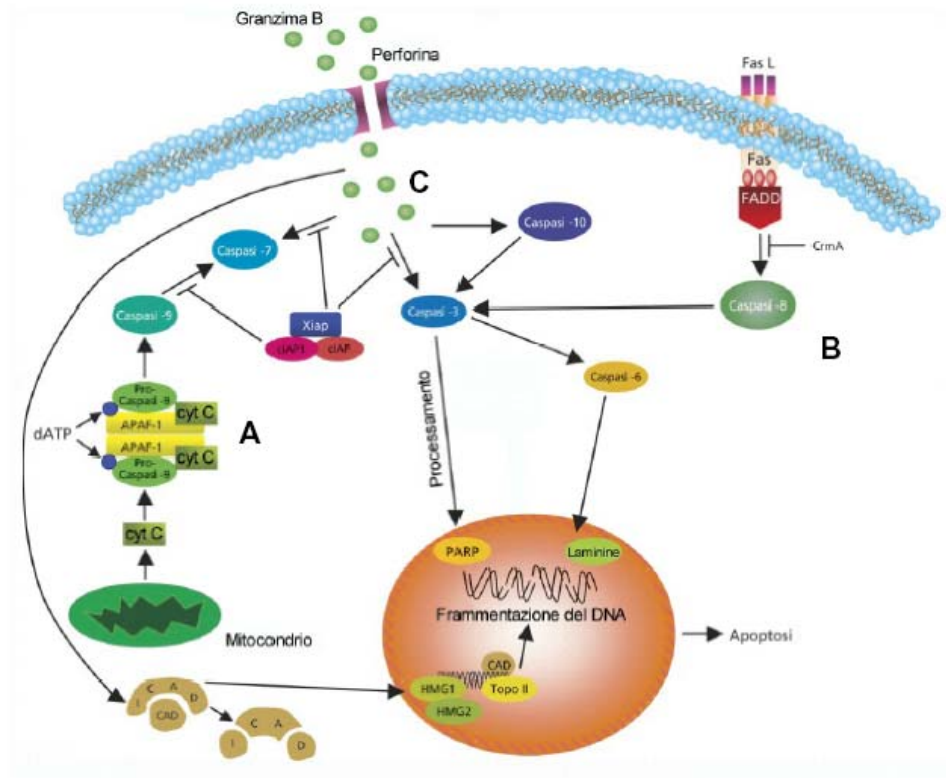


Fig 8 Apoptosi : via intrinseca o mitocondriale e via estrinseca o recettoriale

**AKT E SOPRAVVIVENZA ATTRAVERSO LA REGOLAZIONE
DELLA TRASCRIZIONE DI GENI PRO- E ANTI-APOPTOTICI,
FATTORI DI TRASCRIZIONE “FORKHEAD”, CREB , NFkB,**

Mdm2

Uno dei meccanismi attraverso cui Akt promuove la sopravvivenza cellulare e' la diretta fosforilazione di alcuni fattori di trascrizione che controllano l'espressione di geni pro- o anti-apoptotici. L'azione di Akt e' duplice: da una parte agisce negativamente su fattori che promuovono l'espressione di geni apoptotici, dall'altra, invece, promuove l'attivita' di fattori che controllano l'espressione dei geni legati alla sopravvivenza cellulare. Un esempio di quanto appena enunciato e' rappresentato dalla famiglia di fattori di trascrizione “forkhead”. I tre membri della famiglia “forkhead”, noti come FKHR, FKHL1e AFX, vengono fosforilati da Akt *in vitro* (Biggs et al., 1999; Rena et al., 1999) e *in vivo* in seguito alla stimolazione delle cellule con fattori di crescita (Guo et al., 1999; Zheng et al., 2000). In assenza di stimolo, i “forkhead” sono localizzati prevalentemente nel nucleo, dove promuovono la trascrizione di geni proapoptotici, come *Fas-L*, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TRADD (TNF receptor type I associated death domain) e *Bim* attraverso il riconoscimento di specifici elementi presenti nei promotori dei geni bersaglio (Dijkers et al., 2000). La fosforilazione dei forkhead Akt-

dipendente induce la traslocazione dei fattori di trascrizione dal nucleo al citoplasma (Biggs et al., 1999) dove sono sequestrati dalle proteine 14.3.3 (Brunet et al., 1999) che, a loro volta, hanno una funzione di supporto a quella di Akt. Mutanti di FKHRL1 che non possono venire fosforilati da Akt non sono in grado di lasciare il nucleo in seguito a stimolazione (Brunet et al., 1999). La localizzazione nucleare delle proteine “forkhead”, combinata ad un’attivazione costitutiva di Akt, suggerisce l’importanza di questo pathway nella sopravvivenza delle cellule cancerose. I fattori “forkhead” sono substrato anche di SGK (Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase), un’altra chinasi a valle della PI 3-K, come Akt, suggerendo che la regolazione dei “forkhead” dipenda da un’azione combinata delle due chinasi (Brunet et al., 2001).

La funzione di Akt si traduce in un’azione positiva di controllo dell’attività dei fattori di trascrizione, quando questi promuovono l’espressione di geni antiapoptotici. In alcuni tipi cellulari l’attivazione di Akt, dipendente da IGF-1, induce l’espressione del gene antiapoptotico *bcl-2* (Skorski et al., 1997, Pugazhenti et al., 2000), attraverso l’attivazione del fattore di trascrizione CREB (Cyclic AMP (cAMP) -Response Element Binding Protein), in grado di legarsi specificamente ad una sequenza, nota come CRE (cAMP Responsive Elements) presente nel suo promotore. E’ stato dimostrato che CREB e’ un diretto substrato di Akt (Du et al., 1998) e che la sua fosforilazione e’ responsabile dell’incremento della sua affinita’ di

legame per proteine accessorie necessarie per l'attivazione dei geni bersaglio. CREB è stato anche indicato come mediatore dell'espressione, indotta da Akt, di un altro gene antiapoptotico, *mcl-1* (Wang et al., 1999).

Come CREB, anche i fattori di trascrizione NFκB sono coinvolti nella trascrizione di geni antiapoptotici. In particolare, NFκB è coinvolto nella regolazione della proliferazione, dell'apoptosi e della sopravvivenza cellulare indotti da fattori di crescita e da un vasto numero di citochine. Molti studi definiscono critica l'attività di NFκB nella tumorigenesi (Baldwin AS et al., 2001): l'azione antiapoptotica di NFκB si esplica attraverso l'espressione dei geni antiapoptotici, come *c-Iap1* e *c-Iap2*. Attraverso la regolazione dell'attività trascrizionale di NFκB, Akt è coinvolto nella regolazione dell'espressione del gene di *c-FLIP* che, nel signaling del TNF, inibisce la caspasi-8, bloccando l'apoptosi.

I fattori di trascrizione NFκB sono dimeri formati da subunità di diverso peso molecolare, con proprietà di legame al DNA e di interazione con co-attivatori per iniziare la trascrizione (proprietà transattivante). Le subunità p50 e p52 si legano a specifiche sequenze consenso, note come *rel*, dei promotori dei geni bersaglio, permettendo alle subunità p65/RelA, RelB e c-Rel di stimolarne la trascrizione. Il complesso "canonico" di NFκB è rappresentato dall'eterodimero p65-p50. L'attività trascrizionale di NFκB è regolata da IκB, una proteina inibitrice che si associa al complesso e lo mantiene sequestrato nel citoplasma. La degradazione di IκB, in seguito alla

sua fosforilazione da parte delle chinasi IKK, assicura la liberazione di NFkB, che rapidamente trasloca al nucleo. Il coinvolgimento di Akt nel pathway di NFkB e' stato inizialmente individuato a livello della fosforilazione ed attivazione di IKK α (Romashkova et al., 1999).

Mdm2 (Murine double minute 2) e' un importante regolatore negativo di p53. La sua funzione e' quella di una ubiquitina ligasi, che riconosce il sito di trans-attivazione N-terminale di p53 e aggiunge residui di ubiquitina che indirizzano alla degradazione, mediata dal proteasoma, di p53. Akt lega e fosforila Mdm2 su due residui, la Ser 166 e Ser 186, favorendo l' ubiquitinazione di p53, e promuovendo percio' la degradazione della proteina.(Song et al.,2005).

AKT E SOPRAVVIVENZA ATTRAVERSO LA FOSFORILAZIONE DIRETTA DI PROTEINE PRO-APOPTOTICHE

Oltre ad influenzare la trascrizione di geni pro- o anti-apoptotici, Akt regola direttamente l'attività di alcune proteine che svolgono un ruolo chiave nell'apoptosi. Il meccanismo che controlla la funzione di BAD costituisce un buon modello per questo tipo di regolazione. BAD, una proteina espressa solo in alcuni tipi cellulari, è un membro della famiglia Bcl-2 che promuove l'apoptosi legandosi a membri della medesima famiglia, quali Bcl-2 e Bcl-X_L, in prossimità della membrana mitocondriale. BAD è substrato diretto di Akt, da cui è fosforilato sulla Ser136. BAD fosforilato è riconosciuto dalle proteine 14.3.3., che lo sequestrano nel citoplasma impedendogli di associarsi a Bcl-2 e Bcl-X_L, e bloccando quindi l'apoptosi (Koul et al, 2001). Essenziale per la fosforilazione di BAD ad opera di Akt è l'intervento delle proteine chinasi Raf (del Peso et al., 1997) o p65^{PAK} (Datta et al., 1997; Majewski et al., 1999). Tuttavia, in alcuni modelli cellulari la fosforilazione di BAD avviene in modo del tutto indipendente da Akt: infatti, in questi modelli il blocco del signaling di Akt non ha effetto sulla fosforilazione di BAD né sulla sopravvivenza della cellula (Majewski et al., 1999; Schürmann et al., 2000). Le JNK (Jun N-terminal Kinase) sono proteine che promuovono l'apoptosi in presenza di segnali di stress come radiazioni ionizzanti, shock termico o stress osmotici (Tang et al., 2000). Recentemente, sono state fornite evidenze sull'esistenza di un meccanismo

attraverso cui Akt modula negativamente l'attività delle JNK, basato sulla fosforilazione e inattivazione di ASK1, una chinasi a valle di JNK e della p38 MAPK (Scheid et al., 1998). L'interferenza che si instaura tra pathways indotti dai segnali apoptotici e da quelli proliferativi è un importante argomento di studio nel campo della trasformazione maligna, che si origina quando un meccanismo che sopprime segnali di morte cellulare prende il sopravvento. Tutti i bersagli di Akt finora menzionati sono coinvolti nell'apoptosi prima del rilascio del citocromo *c* dai mitocondri che, a sua volta, regola l'attivazione della cascata delle caspasi. Tuttavia, alcune osservazioni sperimentali suggeriscono che Akt possa anche influenzare eventi post-mitocondriali. Tra questi, la procaspasi-9 è regolata negativamente da Akt (Davis et al., 2000). La fosforilazione della procaspasi-9 da parte Akt, infatti, ne blocca l'attività proteasica intrinseca ed è, pertanto, un evento critico per la regolazione dell'intero processo apoptotico.

Akt promuove la sopravvivenza cellulare anche attraverso la fosforilazione del fattore nucleare Acinus. Questa proteina è localizzata principalmente nel nucleo e induce la condensazione della cromatina durante l'apoptosi. Acinus subisce numerosi processi di proteolisi, mediati da caspasi, che originano un prodotto di parziale proteolisi della proteina, chiamata P17, in grado di condensare la cromatina durante l'apoptosi. La doppia fosforilazione operata da Akt sui residui Ser422 e Ser573 di Acinus

impedisce alla proteina di essere attaccata dalle caspasi, e quindi di generare il frammento attivo P17, con conseguente inibizione del processo di condensazione cromatinica (Hu et al., 2005).

AKT E IL CONTROLLO DELLA PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE

Studi preliminari sulla stimolazione dell'attività di Akt da parte di fattori di crescita mitogenici suggerivano il coinvolgimento di Akt nella progressione del ciclo cellulare. A supporto di questa tesi, nel 1997 uno studio condotto su fibroblasti murini dimostrò che la overespressione di Akt2 accelera la velocità di progressione del ciclo cellulare e induce trasformazione cellulare (Kim et al., 2001). Scoperte più recenti supportano l'importanza del ruolo di Akt durante la progressione della fase G1-S. La transizione cellulare attraverso il "checkpoint" G1/S è regolata dalla proteina pRb (Retinoblastoma protein), che sopprime l'espressione di una serie di geni richiesti per il passaggio in fase S. pRb è fosforilato e inattivato dalle CDK (Cyclin-dependent kinases), che vengono attivate dalle cicline. La chinasi CDK4, dipendente dalle cicline di tipo D, è particolarmente importante per la fosforilazione di pRb nella fase G1 tardiva. Le CDK sono anche negativamente regolate da una famiglia di proteine inibitrici che includono la p21^{CIP1} e la p27^{kip1} (Cardone et al., 1998). Studi effettuati su cellule T hanno dimostrato il coinvolgimento di Akt nella regolazione della fosforilazione di pRb, attraverso il controllo dell'espressione e dell'attività della ciclina D, della p21^{CIP1} e della p27^{kip1} (Cheng et al., 1997). La overespressione della ciclina D è stata riportata in molti tumori umani, in

special modo nel tumore della mammella (Yoeli-Lerner et al., 2005). Elevati livelli di ciclina D promuovono, infatti, una riduzione dei tempi richiesti per svolgere il ciclo cellulare, contribuendo alla progressione tumorale. L'espressione della ciclina D è controllata da segnali coordinati tra loro che alterano la trascrizione, la traduzione dell'RNA messaggero e la stabilità della proteina. Numerose evidenze suggeriscono che Akt regola la ciclina D ad ognuno di questi livelli (Brennan et al., 1997; Gille et al., 1999).

GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) è stata originariamente caratterizzata come un enzima chiave nella regolazione della sintesi del glicogeno in risposta ad insulina (Takuwa et al., 1999). Allo scopo di promuovere la produzione di glicogeno, l'insulina induce l'attivazione di Akt, che fosforila e inattiva la GSK-3 (Muise-Helmericks et al., 1998). Successivamente, l'attività di GSK-3 è stata estesa a processi cellulari che riguardano il differenziamento, la proliferazione e la trasformazione, attraverso meccanismi che probabilmente includono effetti sulla ciclina D (Embi et al., 1980; Cross et al., 1995). GSK-3, infatti, fosforila direttamente la ciclina D, avviandone la degradazione da parte del proteasoma (Ferkey et al., 2000). Questo suggerisce che Akt, mediante l'inattivazione di GSK-3, stabilizzi la ciclina D.

Un altro target di GSK-3 è la β -catenina. Non fosforilata, la β -catenina lega i fattori di trascrizione LEF stimolando l'espressione di geni targets, tra

cui la ciclina D (Kim et al., 2000). La fosforilazione, ad opera di GSK-3, induce la degradazione della β -catenina, riducendo pertanto la trascrizione mediata dai fattori LEF (Diehl et al., 1998). Mutanti di β -catenina non fosforilabili sono stati riscontrati in alcuni tipi di tumori, supportando l'ipotesi che GSK-3 agisca come un soppressore tumorale attraverso il controllo del turnover della β -catenina (Shtutman et al., 1999).

Un meccanismo alternativo, attraverso cui gli stimoli mitogenici trasmettono il loro segnale, e' rappresentato dal controllo della regolazione del sistema di traduzione di RNA messaggeri (mRNA) corrispondenti a proteine richieste per la proliferazione. Tra gli mRNA la cui traduzione aumenta durante la proliferazione ci sono quelli corrispondenti a c-Myc ed alla ciclina D. La proteinchinasi mTOR, attraverso il complesso mTORC1 di cui si e' parlato precedentemente, fosforila proteine che controllano la traduzione del mRNA, svolgendo un ruolo centrale nella regolazione della sintesi proteica (Aberle et al., 1997). A questo proposito e' importante sottolineare che, in questa forma, l'attivita' chinastica di mTOR dipende dalla fosforilazione della proteina PRS40 (Proline rich Akt substrate 40kDa), che e' parte del complesso mTORC1 ed e' un diretto substrato di Akt (Morin et al., 1997; Schmelzle et al., 2000). Il pathway di Akt-mTOR favorisce l'overespressione della ciclina D attraverso l'aumento della traduzione del suo messaggero (Gille et al., 1999) e l'induzione della trascrizione del suo gene, con un meccanismo che coinvolge CREB (Navé

et al., 1999). p21^{CIP1} agisce prevalentemente nel nucleo, dove inibisce l'attività delle CDK e, quindi, la progressione in fase S. Molteplici segnali a monte di p21^{CIP1}, come i pathway di Ras-ERK e Rho, sembrano causare una riduzione dei livelli di p21^{CIP1} necessari per la progressione del ciclo cellulare (Sekulić et al., 2000). Uno studio recente ha dimostrato che Akt fosforila direttamente p21^{CIP1}. In cellule di tumore mammario, in cui la proteina erbB-2 è overespressa, la fosforilazione Akt-dipendente di p21^{CIP1} correla con la traslocazione della proteina dal nucleo e la stimolazione della progressione del ciclo cellulare (D'Amico et al., 2000). Un altro studio dimostra che la fosforilazione di p21^{CIP1} da parte di Akt ne riduce l'associazione con le CDK ed inibisce il suo legame a PCNA, una proteina coinvolta nella replicazione del DNA (Olson et al., 1998). Tuttavia, in questo caso non è stata trovata alcuna correlazione tra la fosforilazione di p21^{CIP1} da parte di Akt e la sua localizzazione all'interno della cellula. La localizzazione citosolica potrebbe essere quindi una proprietà esclusiva delle cellule che overesprimono erbB-2.

La p27^{kip1} è una proteina espressa in quantità difficilmente monitorabili durante la fase G1 ed in molti tumori umani. La regolazione di p27^{kip1} è molto complessa ed avviene allo stadio della trascrizione del suo gene, della traduzione del mRNA e della stabilità della proteina. L'espressione genica sembra essere mediata dai fattori di trascrizione "forkhead", substrati di Akt (Zheng et al., 2000; Zhou et al., 2001). In cellule tumorali in cui si ha un

aumento dell'attività di Akt, il FKHR, bloccato nel citoplasma, contrasterebbe la trascrizione del gene di p27^{kip1}. Come per p21^{CIP1}, anche p27^{kip1} è un diretto substrato di Akt e, come per p21^{CIP1}, la fosforilazione ne indurrebbe la traslocazione citoplasmatica solo in cellule che overesprimono erbB-2 (Rössig et al., 2001).

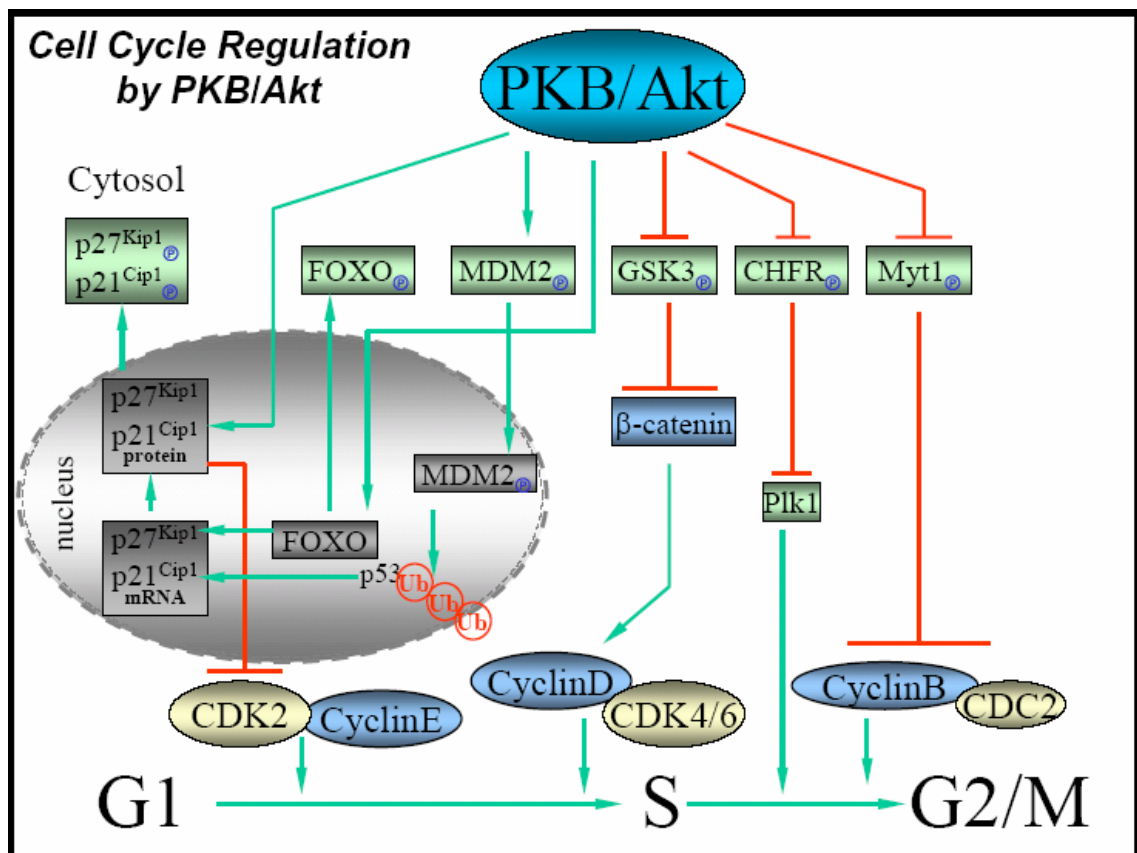


Fig 9 Akt e la regolazione del ciclo cellulare

Brazil et al, Trends Biochem Sci. 2004 29 : 233-42

RUOLO DI AKT NEL METABOLISMO CELLULARE

In risposta a fattori di crescita, il signalling di Akt regola l'uptake e il metabolismo dei nutrienti tramite meccanismi cellulari intrinseci e tramite meccanismi tessuto specifici.

Una delle piu' importanti funzioni fisiologiche di Akt e' quella di stimolare l'uptake del glucosio in risposta all'insulina. L'isoforma Akt 2 gioca un ruolo centrale nel metabolismo insulino-dipendente poiche', in adipociti stimolati con insulina, e'coinvolta nella traslocazione in membrana plasmatica di molecole trasportatrici di glucosio, chiamate Glut4.

Il meccanismo esatto con cui Akt svolge questa funzione non e' ancora ben conosciuto, ma sembra essere coinvolta la proteina AS160.(Eguez L et al., 2005; Sano et al., 2003) Questa proteina viene fosforilata da Akt su cinque residui, ma solo due di questi, la Ser588 e la Thr642, sembrano giocare un ruolo centrale nel meccanismo di trasporto in membrana dei trasportatori Glut4, in quanto la loro mutazione ad alanina blocca la traslocazione in membrana dei trasportatori. La fosforilazione da parte di Akt della proteina AS160, quindi, ne provoca la inibizione e promuove la traslocazione delle molecole di Glut4 in membrana.

Sono stati suggeriti anche altri meccanismi di regolazione di questo processo indipendenti da AS160 e che coinvolgono substrati putativi di Akt come PIKfive(PIK-5),(Berwick et al.,2004) che dopo essere stata fosforilata dalla

chinasi Akt, si attiva e facilita la traslocazione in membrana delle molecole trasportatrici.

Oltre ad avere un ruolo attivo nell'uptake del glucosio stimolato da insulina, Akt sembra regolare l'espressione in membrana di trasportatori di altri nutrienti, come aminoacidi, attraverso un meccanismo mediato dal complesso mTORC1, non ancora del tutto chiaro.

E' particolarmente importante l'attivazione di Akt nel muscolo e nel fegato, dove viene inibita la glicogeno sintasi chinasi 3(GSK 3), con conseguente attivazione della sintesi di glicogeno. Akt regola in questo modo il metabolismo lipidico attraverso la fosforilazione e inibizione della GSK3 poiche', in condizioni fisiologiche, i substrati a valle di questa chinasi promuovono la degradazione di proteine regolatorie coinvolte nella sintesi del colesterolo e degli acidi grassi. Akt, inibendo la GSK3, promuove la stabilita' dei suoi substrati ed aumenta la produzione di lipidi.(Elstrom et al.,2004)

Akt media inoltre la fosforilazione di FOXO1, e contribuisce cosi' all'omeostasi del glucosio poiche' promuove la sintesi di glucosio epatico e regola il differenziamento di cellule coinvolte nel controllo del metabolismo.

Le cellule cancerose che si trovano in un ambiente povero di nutrienti e ossigeno (ipossia), si adeguano a tali condizioni grazie alla presenza di Akt che accelera il processo di glicolisi, cosa che permette di spiegare l'elevato metabolismo glucidico di queste cellule. L'abilita' di Akt nel far progredire il processo glicolitico e' dovuto almeno in parte ad una induzione

dell'espressione di enzimi glicolitici mediata dal fattore di trascrizione HIF α . Si tratta di un fattore di trascrizione attivato dopo stimolazione con insulina e altri fattori di crescita, la cui funzione e' di fondamentale importanza nella risposta all'ipossia, poiche' induce la trascrizione di diversi geni coinvolti nell'angiogenesi, inclusi il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e i trasportatori del glucosio (GLUTs).

LE LAMINE

L'involucro nucleare è composto da due doppie membrane fosfolipoproteiche concentriche, ciascuna di spessore di 8 nm circa, che delimitano il lume della *cisterna perinucleare* di 15-40 nm. Tale cisterna è in continuità con il reticolo endoplasmico rugoso. La cisterna è interrotta a livello dei pori nucleari, dove le due membrane si fondono. Alla membrana interna è legata una struttura proteica tridimensionale chiamata **lāmīna nucleare**, composta da quattro tipi di lamīne (A, B1, B2, C), che identifica il filamento intermedio specifico per il *nucleoscheletro*, il cui scopo è di fornire un sostegno per il nucleo e un ancoraggio per la cromatina. Nelle cellule dei metazoi esistono due tipi di **lamīna**, A e B, che differiscono per lunghezza e punto isoelettrico. Nella maggior parte delle cellule umane si riscontrano quattro lamine diverse (Fig. 11):

- Lamine di **tipo B**, di cui fanno parte la B1 e la B2, espresse dal gene LMNB1 e LMNB2, rispettivamente nei loci 5q23 e 19q13.
- Lamine di **tipo A**, comprendenti la prelamina A e lamine A e C, prodotti di splicing alternativo del gene LMNA, nel locus 1q21.

Per le loro caratteristiche strutturali e per la loro sequenza amminoacidica, le lamine vengono inserite nella classe dei filamenti intermedi del V tipo. Infatti, differiscono dai filamenti intermedi citoplasmatici per la prima parte della loro struttura ad alfa-elica, che è più lunga di 42 amminoacidi. Come tutti i

filamenti intermedi, sono proteine fibrose (60-80.000 Da) che si uniscono fra loro formando filamenti. Dapprima due lamine associano i loro tratti ad alfa-elica producendo una struttura *coiled coil*, poi questi dimeri si associano a numerosi altri sia in direzione testa-coda che lateralmente. Durante la mitosi, le lamine vengono depolimerizzate in seguito a fosforilazione. Tale processo è catalizzato dalla proteinchinasi ciclina-dipendente Cdc2 (Takano et al., 2004), che fosforila tutti i tipi di lamina. Dopo la depolimerizzazione, le cicline A e C vengono liberate nel citoplasma come dimeri; mentre le cicline B rimangono attaccate alle vescicole che si sono formate per disgregazione dell'involucro nucleare.

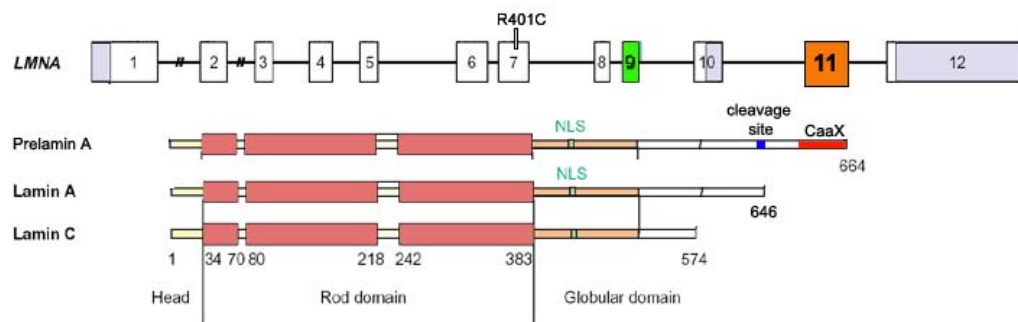


Fig 11 Struttura delle lamine di tipo A

Dunque, il processo di depolimerizzazione è necessario affinché il nucleo possa dissolversi e permettere il proseguimento della mitosi. Il ruolo delle lamine durante questa fase del ciclo cellulare non è ancora ben delineato, ma è probabile che siano funzionali alla riorganizzazione nucleare e alla modificazione dell'assetto genomico. Entrambe le lamine, A e B, possono trovarsi anche nel nucleoplasma, dove formano dei foci interni. In questi foci, ed in particolare nei foci di tipo A, oltre alle lamine sono presenti fattori di trascrizione, fattori di splicing e importanti proteine associate alla proliferazione cellulare come pRb. In aggiunta, associate a queste strutture di lamina interne al nucleo si trovano altre proteine con siti di legame per la cromatina. Evidenze biochimiche e microscopiche suggeriscono che i foci di lamina siano punti di ancoraggio per la cromatina, quindi coinvolti nel controllo dell'espressione genica. La rete di lamina e cromatina forma uno 'scaffold intelligente', che può subire modificazioni dinamiche in ogni momento del ciclo cellulare. Le lamine A e C sono prodotti di splicing alternativo: sono infatti identiche per i primi 566 amminoacidi, ma differiscono nella porzione carbossi-terminale. A differenza della lamina C, la lamina A deriva dal precursore prelamina A, caratterizzata all'estremità C-terminale dalla presenza di un segnale -CAAX, soggetto a modificazioni post traduzionali. Queste iniziano con la farnesilazione della cisteina da parte di una farnesiltransferasi citosolica. In seguito alla farnesilazione, gli ultimi tre amminoacidi della prelamina A (cioè i residui -AAX del motivo CAAX)

vengono tagliati da endoproteasi di membrana localizzate nel reticolo endoplasmico rugoso, e precisamente ZMPSTE24 e RCE1. La farnesil-cisteina rimasta, viene metilata ad opera di una metiltransferasi ICMT.

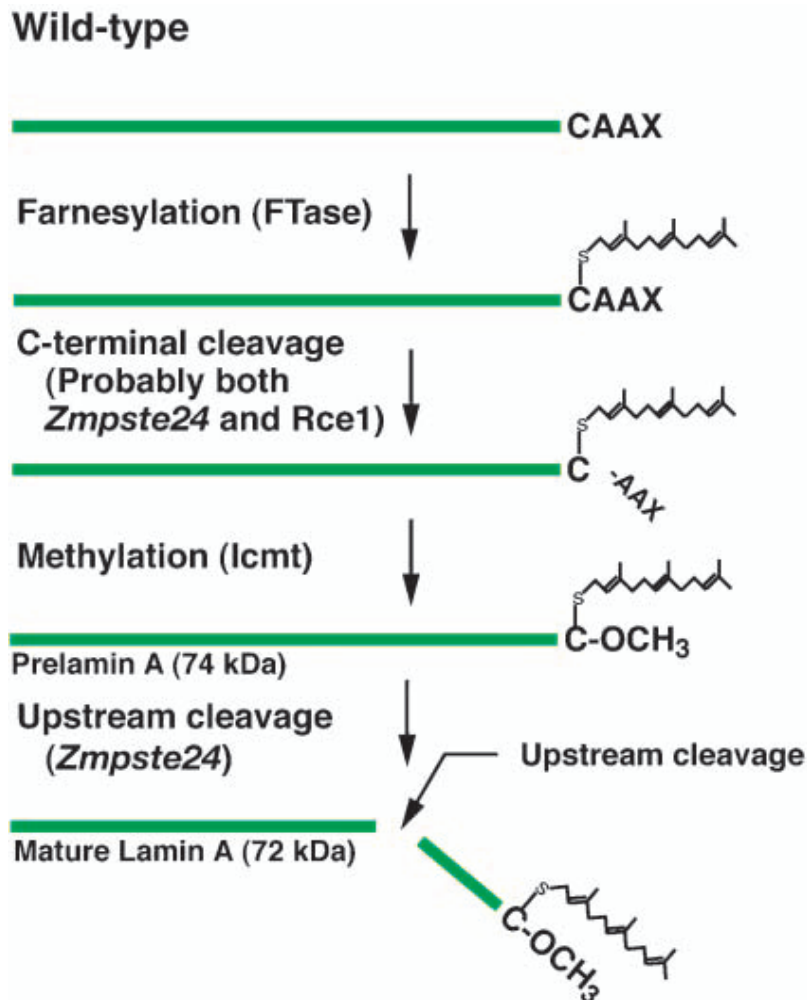


Fig 12 Biogenesis of Lamin A

Stephen G. Young, Loren G. Fong, and Susan Michaelis

Prelamin A, *Zmpste24*, misshapen cell nuclei, and progeria—new evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis

J. Lipid Res. 46, 2005

Ognuna delle modificazioni del motivo CAAX aumenta la idrofobicità del tratto C-terminale della prelamina A, rendendolo adatto ad ancorarsi alla membrana nucleare interna. L'ultima modificazione consiste nel taglio degli ultimi 15 amminoacidi della prelamina A, ad opera della stessa endoproteasi ZMPSTE24, originando così la lamina A matura.

La lamina nucleare è stata recentemente oggetto di particolare attenzione, perché sono state identificate 220 mutazioni all'interno del polipeptide lamina A/C, che sembrano essere alla base dell'insorgenza di una serie di patologie muscolari chiamate collettivamente laminopatie. Le **laminopatie** sono malattie ereditarie, clinicamente diverse tra loro, quali **distrofia muscolare, cardiomiopatia, lipodistrofia, insulinoresistenza, diabete ed invecchiamento precoce**, dipendenti da mutazioni di geni che codificano sia proteine dell'involucro nucleare, quali le lamine di tipo A (LMNA), che proteine collegate alle lamine (EMD, LBR, LAP2). Le laminopatie si manifestano clinicamente dopo la nascita, si sviluppano progressivamente durante l'infanzia e l'adolescenza e spesso conducono a morte precoce. La carenza di conoscenze sui meccanismi patogenetici ha influito negativamente sullo sviluppo di terapie adeguate.

OBIETTIVO DELLA RICERCA

L'ultimo ventennio ha visto un crescente interesse nello studio della trasduzione del segnale a livello nucleare, ed in particolare di quello inositide-dipendente.

I fosfoinositidi sono componenti minori della membrana plasmatica, che in risposta a numerosi stimoli originano secondi messaggeri lipidici.

Il metabolismo degli inositidi non e' pero' limitato alla membrana plasmatica. Infatti, negli ultimi quindici anni e' stata confermata la presenza di un ciclo degli inositidi localizzato nel nucleo, e completamente indipendente da quello noto in prossimita' della membrana plasmatica. Questo ha suscitato grande interesse per la comprensione del ruolo svolto dai diversi componenti del ciclo, ed in particolar modo dalle chinasi lipidiche e proteiche, che sono analoghe a quelle che operano nel ciclo degli inositidi a valle della membrana plasmatica. Nella cellula, la proteinchinasi Akt puo' localizzarsi nel nucleo sia in forma attiva, successivamente alla sua fosforilazione in prossimita' della membrana plasmatica, sia in forma inattiva, grazie all'azione di proteine partner che ne facilitano la traslocazione. Benche' il meccanismo di traslocazione sia stato ampiamente illustrato, anche tramite osservazione diretta *in vivo*, la funzione fisiologica che Akt svolge a livello nucleare non e' nota. Si sa tuttavia che uno dei principali bersagli di Akt, il fattore di trascrizione FoXo della famiglia Forkhead, viene fosforilato da Akt proprio

all'interno del nucleo, e solo in seguito a questa fosforilazione puo' traslocare nel citoplasma dove viene sequestrato dalle proteine 14.3.3. La comprensione del ruolo fisiologico di Akt nel nucleo rappresenta percio' l'obiettivo generale di questo studio. Poiche' cio' che meglio definisce la funzione di una proteina chinasi sono i substrati da essa fosforilati, questo studio e' stato mirato all'identificazione dei substrati nucleari della proteinchinasi Akt, utilizzando un approccio innovativo di proteomica funzionale.

Tale approccio e' schematizzato in figura 13.

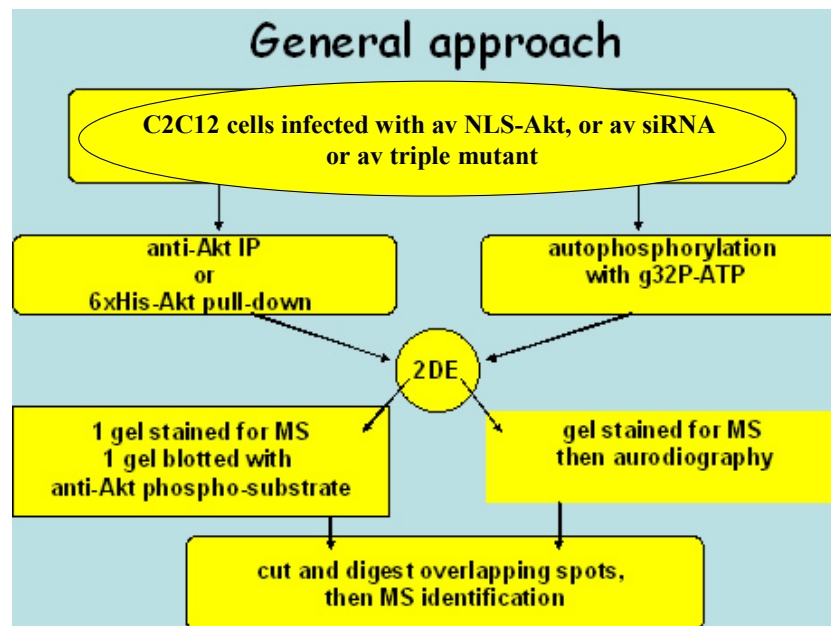


Fig 13 General Approach

MODELLO SPERIMENTALE

Mioblasti C2C12 sono stati coltivati in vitro e, dove indicato, infettati con un retrovirus codificante per una forma di Akt indirizzata al nucleo attraverso l'aggiunta di una sequenza di localizzazione nucleare. Nuclei purificati da tali cellule sono stati sottoposti a due diversi trattamenti. In un caso il lisato nucleare e' stato sottoposto a elettroforesi bidimensionale (2DE) in duplicato, poi un gel e' stato colorato con soluzione colloidale di Blue Coomassie per evidenziare le proteine risolte, mentre l'altro gel e' stato sottoposto a western blotting e la membrana rivelata con un anticorpo anti-Akt fosfomotivo, in grado di riconoscere tutte le proteine contenenti il motivo RxRxxS/Tψ nella sua forma fosforilata. Successivamente le proteine corrispondenti agli spot riconosciuti dall'anticorpo sono state tagliate dal primo gel ed identificate tramite analisi MALDI-Tof.

In un secondo modello, il lisato nucleare e' stato sottoposto ad esperimenti di autofosforilazione in vitro, in presenza di γ -³²P-ATP. Successivamente, le proteine sono state risolte attraverso 2DE, il gel e' stato colorato e autoradiografato per evidenziare le proteine da tagliare. Successivamente, lo stesso esperimento e' stato ripetuto utilizzando nuclei di cellule C2C12 infettate con un retrovirus codificante per siRNA di Akt1, poi processati come sopra. Questo approccio sperimentale ha permesso l'identificazione di nove proteine, non precedentemente descritte, fosforilate da Akt in vitro, che

possono essere considerate suoi substrati putativi. In questa tesi verranno presentati i risultati dello studio di validazione delle lamine di tipo A come substrati fisiologici di Akt.

Poiche'la letteratura recente ha riportato l' identificazione di numerosi substrati putativi che non sono stati confermati da successivi esperimenti condotti con maggior rigore, questo studio e' stato sviluppato facendo costante riferimento ad una sorta di decalogo per la validazione dei substrati putativi di Akt, i cui punti principali sono elencati di seguito (Manning e Cantley, 2007).

- 1) **PRESENZA DI UNA O PIU' SEQUENZE CONSENSO**: e' importante riscontrare la presenza, nella sequenza aminoacidica del substrato putativo, del motivo RxRxxS/Tψ.
- 2) **CONSERVAZIONE NELLA SCALA EVOLUTIVA** del motivo di fosforilazione. L'elevata conservazione supporta la possibilita' che il substrato putativo sia anche un substrato fisiologico
- 3) **FOSFORILAZIONE IN VITRO**: Akt (ricombinante o purificato) deve essere in grado di fosforilare la proteina substrato *in vitro*.
- 4) **SITO DI FOSFORILAZIONE**: deve essere identificato il sito di fosforilazione. La mutagenesi del sito di fosforilazione e l'espressione della proteina mutata puo' essere utile per la definizione del ruolo fisiologico dell'evento.
- 5) **FOSFORILAZIONE IN VIVO**: la proteina substrato deve essere fosforilata *in vivo*, sul sito identificato, a seguito dell'attivazione fisiologica

di Akt. A questo scopo, un approccio sperimentale particolarmente efficace e' la produzione di un anticorpo contro il fosfopeptide che riproduce il sito fosforilato da Akt nella proteina in esame.

6) SPECIFICITA' DELLA FOSFORILAZIONE: la fosforilazione deve essere attribuibile alla chinasi Akt e non ad altre chinasi a valle di Akt o appartenenti alla stessa famiglia, e quindi con specificita' di substrato simile (es SGK). L'uso di inibitori specifici, di mutanti dominanti positivi e dominanti negativi di Akt puo' essere utile, ma e' l'inibizione dell'espressione di Akt con siRNA diretti contro le singole isoforme il metodo piu' efficace per la dimostrazione di questo punto.

MATERIALI

Anticorpi

Lamina A/C N-terminale (WB alla diluizione di 1: 1000, IF 1:200, IP 2 μ g), Akt 1 (WB 1:500, IP 2 μ g), Akt pSer473 (WB 1: 1000), 14.3.3 γ (WB 1: 1000), parp (WB 1: 1000), I κ B (WB 1: 1000), β catenina (WB 1: 1000) sono stati acquistati dalla ditta SANTA CRUZ (CA, U.S.A).

Tubulina, Actina (WB 1: 250), flag (WB 1: 500) sono stati acquistati dalla ditta SIGMA ALDRICH (MO, U.S.A).

Prelamina (WB 1:2000, IF 1:1000) e' stato donato dalla Dr.ssa Loren Fong (UCLA, CA, U.S.A).

Phospho LAMINA Ser404 (WB 1:1000) e' stato prodotto dal Dr.Oriano Marin, Dipartimento di Chimica Biologica, Padova.

Akt phosphosubstrate (WB 1:1000) e' stato fornito dalla ditta CELL SIGNALING (MA, U.S.A)

Enzimi

λ -PPase e tampone di defosforilazione sono stati acquistati dalla ditta NEB (New England Biolabs, MA, U.S.A).

Proteine ricombinanti e costrutti virali

Akt ricombinante e' stato donato dal laboratorio di Dario Alessi (Dundee, UK).

Il costrutto adenovirale Akt-NLS e' stato donato dal Dr. Mark Susmann (San Diego, CA).

Il costrutto lentivirale Akt triplo mutante (S473A, T308A, K127A) e' stato acquistato dalla ditta ADDGENE (MA, U.S.A).

Inibitori e fattori di crescita

Insulina bovina umana, MG132, Z-VAD, LY29400, clorochina, mevinolin (Lovastatin), E64 sono stati acquistati dalla ditta SIGMA ALDRICH.

Tutti i materiali e reagenti per colture cellulari sono delle migliori marche (CORNING, EUROCLONE, GIBCO).

Reagenti per elettroforesi monodimensionale e bidimensionale hanno un alto grado di purezza e sono stati acquistati dalla ditta BIO-RAD (CA, U.S.A)

METODI

- COLTURE CELLULARI

Mioblasti murini C2C12 e cellule HEK293T sono state mantenute in terreno DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) arricchito di siero bovino fetale (FBS) 10%, glutammica (2mM) e penicillina/streptomicina (100U/ml) in incubatore a 37 °C ad una percentuale di CO₂ del 5%.

Il differenziamento dei mioblasti e' stato indotto incubando le cellule in DMEM con siero fetale di cavallo (FHS) 0.5% per i tempi riportati.

La stimolazione della via di segnale PI3K/Akt e' stata ottenuta trattando entrambe le linee cellulari, mantenute in DMEM senza FBS per 24 ore, con Insulina 0.1 µM per 60 minuti.

Per arricchire la popolazione cellulare dei mioblasti di cellule in G2 G2/M le cellule sono state mantenute in assenza di siero per 24 ore e trattate con roscovitine 50µM per 24 ore.

Nei diversi esperimenti, le cellule sono state trattate con: MG132 20 µM per 1ora, Z-VAD 20 µM per 1 ora, clorochina 50 µM per 1 ora, mevinolin 25 µM per 16 ore, E64 50µM per 1 ora, roscovitina 50 µM per 24 ore.

- TRASFEZIONI ED INFEZIONI

Cellule HEK293T sono state trasfettate transientemente con la metodica del Calcio-Fosfato.

Le cellule vengono seminate il giorno prima della trasfezione in modo da arrivare ad una confluenza del 50% per il trattamento. Dopo la trasfezione, le cellule vengono mantenute in DMEM completo per 48 ore.

Plasmidi: la sequenza della proteina Lamina A, fusa al *tag* flag (M2), clonata nel vettore di espressione pCI, come descritto da Kumaran et al. (2002), e' stata utilizzata come template per produrre i mutanti S404A e S301A, utilizzando il sistema Quickchange strategy (Stratagene, La Jolla, CA, USA), seguendo le indicazioni del produttore.

I primers per costruire i mutanti sono i seguenti:

S301A**senso**:CGAATCCGCATTGACGCCCTCTCAGCCCAG

antisenso: CTGGGCTGAGAGGGCGTCAATGCGGATTCG

S404A**senso**:GCCGCGCCTCCGCCCCTCCTCCC

antisenso: GGGAGGAGTGGGCGGAGGCGCGGC

Per silenziare transientemente l'espressione di Akt1, i mioblasti C2C12 sono stati trasfettati con i vettori che esprimono short hairpin (siRNA) per Akt1 murino, sotto il promotore murino U6 (Turner et al., 2003), con il kit Cell Line

nucleofector Kit V e con elettroporatore AMAXA, seguendo le indicazioni del produttore.

Il costrutto Adenovirale Akt-NLS e' stato donato dal laboratorio del Dr. Mark A. Sussman (San Diego,U.S.A) e utilizzato come descritto (Sussman et al.,2004). Brevemente, le cellule sono state seminate il giorno prima dell'infezione in modo da arrivare al 50% di confluenza il giorno seguente. Il surnatante contenente il virus, prodotto in cellule HEK293T, viene aggiunto al terreno di crescita e lasciato per 72 ore.

- **ESTRATTI PROTEICI, IMMUNOPRECIPITATI E SAGGI DI PULL DOWN**

Per ottenere estratti proteici totali, le cellule vengono tripsinizzate e centrifugate a 1300 rpm per 10 minuti, segue un lavaggio in PBS e una lisi in tampone RIPA BUFFER (Tris-Cl 20 mM pH 7.0, glicerolo 10% (v/v), NP-40 1% (v/v), EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, Sodio Pirofosfato 5 mM, Inibitori di proteasi 10 mM).

Il campione lisato viene mantenuto in ghiaccio per 15 minuti, segue un ciclo di sonicazione di 10 secondi e una centrifugazione a 13.000 rpm per 15 minuti. Si preleva il surnatante che puo' essere conservato a - 20 °C.

Gli estratti proteici nucleari vengono ottenuti lisando le cellule in un tampone ipotonico (Tris-Cl 20 mM PH 7.8, NP-40 1% (v/v), inibitori di proteasi

(Protein Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich), in misura di 1ml/10⁶ cellule, il campione viene lasciato in ghiaccio per 5 minuti, viene aggiunta acqua nella stessa quantità del tampone precedentemente utilizzato, si lascia in ghiaccio per altri 5 minuti, si centrifuga a 1200 rpm per 10 minuti, si elimina il surnatante e si lava il campione con TRIS-Cl 50 mM PH 7.8 + MgCl₂ 2 mM.

Il pellet ottenuto da questo lavaggio si lisa in tampone RIPA BUFFER.

L'immunoprecipitazione è stata condotta partendo da almeno 2 mg di estratti proteici totali chiarificati con 30 µL di Proteina A/G Beads (Santa Cruz); in agitazione a 4 °C per 1 ora, si centrifuga a 10.000 rpm per 2 min, al surnatante si aggiungono 30 µL di Proteina A/G Beads e 2 µg di anticorpo. Si lascia in agitazione a 4 °C per 16 ore, si centrifuga a 10.000 rpm per 2 minuti, seguono due lavaggi in RIPA BUFFER e un lavaggio in Tris-Cl 10 mM PH 7.4. Al pellet si aggiunge Laemmli Buffer e si bolle a 100 °C per 5 minuti.

I saggi di pull down sono stati ottenuti partendo da immunoprecipitati, trattati e non con l'enzima λ-PPase, che vengono incubati con estratti proteici totali per 16 ore a 4 °C. I campioni sono stati risolti in SDS-PAGE, trasferiti su membrana e rivelati con gli opportuni anticorpi.

- DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA

La determinazione quantitativa delle proteine contenuta nelle preparazioni di frazioni cellulari viene effettuata con il metodo di Bradford (Bradford, 1976)

che permette di dosare, con buona sensibilità, quantità di proteine comprese tra 1 µg e 5 µg. Mediante l'aggiunta di acqua ogni campione viene portato ad un volume di 800µL a cui si aggiungono 200 µL di soluzione Bradford (BIO-RAD).

Si procede alla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Lo spettrofotometro, in base ad una retta di taratura basata su standard di BSA da 0.5 a 5 µg, risale alla concentrazione dei campioni per interpolazione.

- SDS-PAGE e Western Blot

Una uguale quantità proteica di lisati (80 µg) viene separata mediante SDS-PAGE. Il tampone per la corsa in SDS-PAGE, aggiunto in ogni campione per denaturare le proteine, è così composto: Tris-Cl 20 mM PH 7.8, SDS 2% (p/v), glicerolo 20 % (v/v), DTT 0.6 M e 1.2 mg di blu di bromofenolo. La corsa elettroforetica su gel all' 8% -10 % di acrilamide avviene nell'apposito apparecchio a 25 mA per un tempo variabile che va dai 40 minuti a 1 ora. Le proteine vengono poi trasferite dal gel su membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) Immobilon-P (MILLIPORE), bagnata precedentemente in metanolo 100% e velocemente immersa nel tampone di trasferimento (Tris-Cl 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 20% e SDS 0.1%). Il trasferimento avviene nell'apposito apparecchio a 350 mA e in tempi variabili dai 50 minuti a 1 ora

e 30 minuti, a seconda dello spessore del gel e delle dimensioni della proteina che si vuole trasferire. La membrana viene incubata con un tampone TBS (Tris-Cl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM) contenente BSA 4% per 20 minuti, segue l'incubazione nello stesso tampone a cui si aggiunge l'anticorpo primario nella diluizione opportuna per un tempo di 16 ore. Successivamente si eseguono due lavaggi in TBS + Tween 20 (0.1%) e incubazione con anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi per circa 20 minuti. Dopo altri 2 lavaggi si procede alla fase di rivelazione. Il sistema di rivelazione prevede l'utilizzo di una soluzione contenente Luminolo e H₂O₂ che, per azione della perossidasi, dà luogo ad una reazione chemiluminescente in corrispondenza del punto in cui si è formato il complesso antigene-anticorpo; tale reazione è evidenziata ponendo sopra la membrana, per un tempo variabile (da pochi secondi a qualche minuto), una lastra fotografica che viene impressionata dalla luce. In alternativa si può ottenere l'acquisizione del segnale luminoso mediante lo strumento Kodak Image Station 440 CF.

- ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

Gli estratti proteici nucleari ottenuti da cellule infettate con costrutti recanti Akt triple mutant e Akt-NLS sono stati analizzati in elettroforesi bidimensionale.

150 µg di lisato sono stati purificati con Clean-up kit (BIO-RAD) e solubilizzati in tampone per 2DE adatto all'isoelettrofocusing (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 1%, anfoline 0.8%). Il campione viene caricato su IPG STRIP di 7 cm dal range di pH 3-10, segue una fase di reidratazione attiva a 50 V per 16 ore, 250 V per 30 minuti, 2000 V per 2 ore, 4000 V per 2 ore e sia mantengono i 4000 V fino al raggiungimento di 20000 Volt/Hours. Dopo la prima dimensione con isoelettrofocusing, le strip seguono una prima fase di riduzione dei gruppi sulfidrilici in tampone TEF (urea 6 M, glicerolo 30%, SDS 2%, anfoline 0.8%) a cui si aggiunge DTT 0.125 mM e si lasciano in agitazione per 15 min. Segue una fase di alchilazione aggiungendo iodacetamide 250 mM allo stesso tampone TEF e si lascia in agitazione per 8 min.

Le strip vengono in seguito interfacciate su gel d'acrilamide e bloccate con agarosio 0.5% in tampone Tris-glicina. La corsa in seconda dimensione viene condotta a 120 V a 4 °C per circa 2 ore. Il gel ottenuto viene colorato con Coomassie staining o sottoposto ad immunoblot e rivelato con gli opportuni anticorpi.

- SAGGI DI FOSFORILAZIONE IN VITRO

L'attività chinasi di Akt sulle Lamine è stata saggiata tramite esperimenti che richiedono l'utilizzo di ATP radioattivo.

I campioni immunoprecipitati con l'anticorpo anti Lamina A/C vengono lavati con RIPA BUFFER e alla miscela viene aggiunta 3 µg della proteina ricombinante Akt in un tampone contenente Tris-Cl 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 25 mM, ATP 80 mM e 50 µCi (γ^{32})ATP. I campioni si lasciano a 37 °C per 20 minuti. Gli immunoprecipitati fosforilati in vitro sono stati separati in SDS-PAGE, trasferiti su membrana PVDF e le bande relative alle proteine fosforilate sono state rivelate per autoradiografia e in seguito digerite con tripsina.

- ANALISI DEI FOSFOAMINOACIDI

Per l'identificazione degli aminoacidi fosforilati da Akt sulle Lamine di tipo A e' stato usato il protocollo descritto in Perich et al., 1992. I campioni. dopo la fosforilazione. sono stati idrolizzati tramite incubazione per 4 ore a 110 °C con HCl 6 N e quindi sottoposte ad elettroforesi su carta ad alto voltaggio a pH = 1.9 per 2.5 ore, in presenza di fosfoaminoacidi (SerP, ThrP, TyrP) come riferimento della migrazione, e vengono poi rivelati tramite colorazione con ninidrina.

- SAGGIO DI ATTIVITA' DI AKT SUI PEPTIDI SINTETICI
LAMINA SER404 E LAMINA SER301

I peptidi sintetici sono stati sintetizzati dal laboratorio del Dr.O.Marin.

Le reazioni per misurare la cinetica di fosforilazione sono state effettuate a 30 °C per 10 minuti mantenendo fisse la quantità di Akt ricombinante (3 µg) e la concentrazione di (γ 32-P) ATP (50 µM) mentre le concentrazioni dei peptidi erano crescenti.

I peptidi sono poi stati *spottati* su cartine di fosfocellulosa ed è stato utilizzato uno scintillatore per misurare la radioattività.

- TRATTAMENTO CON ENZIMA λ -PPASE

Dove descritto, gli immunoprecipitati sono stati incubati con 50 Unità dell'enzima λ -PPase (NEB, New England Biolabs) per 30 minuti a 37 °C in un tampone fornito dal produttore.

- IMMUNOFLUORESCENZA E DAPI

I miblasti C2C12 sono stati seminati su vetrino coprioggetto e, dove indicato, trattati con Insulina. Dopo il trattamento, i vetrini sono stati lavati con PBS e fissati con Paraformaldeide 4% in PBS per 15 min a temperatura ambiente, seguono 2 lavaggi in PBS, una fase di permeabilizzazione con Triton X 100 (0.1%) per 10 minuti, una fase di saturazione con BSA (Bovine Serum Albumin) 4% in PBS per 1 ora e una fase di incubazione con l'anticorpo primario condotta a 4 °C per 16 ore. Le cellule sono state incubate per circa 45

minuti con l'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo a temperatura ambiente.

Alternativamente, i mioblasti C2C12 fissati su vetrino come sopra, dopo opportuno trattamento per il differenziamento venivano sottoposti a colorazione DAPI.

I vetrini, al termine delle varie incubazioni, sono stati lavati nuovamente con PBS e successivamente viene aggiunto il mezzo di montaggio, costituito da glicerolo al 90%, e il vetrino portaoggetti. I preparati sono stati quindi analizzati usando il microscopio a fluorescenza NIKON ECLIPSE TE2000-U.

RISULTATI

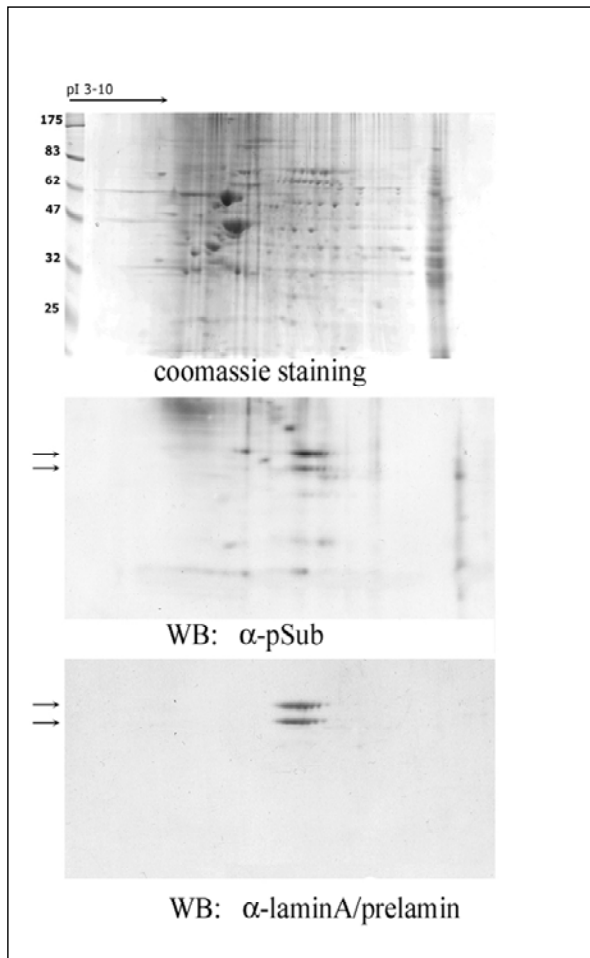
1) Identificazione di substrati putativi di Akt

Mioblasti C2C12 sono stati infettati con un adenovirus che codifica per la chinasi Akt, fusa ad una sequenza di localizzazione nucleare. I nuclei purificati da queste cellule sono stati utilizzati per la ricerca di substrati nucleari di Akt non ancora identificati. In breve, le proteine nucleari sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale, in duplicato, usando IPG-STRIP, range di pH 3-10. Un gel e' stato colorato con colorante Blue Comassie colloidale (Fig 1a) mentre l'altro e' stato sottoposto ad immunoblotting e rivelato con l'anticorpo anti-Akt fosfosubstrato, in grado di riconoscere la sequenza motivo di Akt nella forma fosforilata (Fig 1b). Gli spot riconosciuti dall'anticorpo sono stati individuati nel gel colorato per sovrapposizione, tagliati e processati per l'identificazione tramite spettrometria MALDI-tof. In particolare, le proteine corrispondenti agli spot indicati dalle frecce (Fig 1b) sono state identificate come lamine di tipo A (tabella 1). A conferma di questo risultato, pertanto, la membrana e' stata sottoposta a stripping prima di essere rivelata nuovamente con un anticorpo diretto contro la porzione N-terminale delle lamine di tipo A, e cioe' contro un epitopo comune sia alla proteina precursore, prelamina A, che alle lamina A/C. Come previsto, l'anticorpo rivela due bande in corrispondenza del peso

atteso di prelamina A (75kDa) e lamina A/C (72-70 kDa), confermando l'identità delle proteine (Fig 1c).

L'analisi della sequenza delle lamine A attraverso l'algoritmo "*scansite*" ad alta stringenza (Obenauer et al., 2003)

conferma la presenza di almeno due motivi consenso per la fosforilazione da parte di Akt, in corrispondenza rispettivamente della serina 301 e della serina 404, entrambi residui altamente conservati (Fig 2)



1 a

1 b

1 c

Fig 1

Estratti nucleari di mioblasti C2C12 in doppio sono stati analizzati mediante elettroforesi bidimensionale su IPG strip pH 3-10 per la prima dimensione, e 10% SDS-PAGE per la seconda dimensione. a) un gel è stato colorato con colorante Coomassie Blue colloidale, b) l'altro gel è stato trasferito su membrana PVDF e incubato con l'anticorpo anti-Akt fosfosubstrato (α -Akt psubstrate) e successivamente con l'anticorpo anti-lamina A (N-terminale).

Tryptic peptides identified by LC-MS/MS analysis as lamin A

Sequence	Mascot Score	Exp. Value
R.LQLELSK.V	50	0.019
R.LVEIDNGK.Q	47	0.042
K.LEAALGEAK.K	53	0.0097
R.DLEDLAR.E	36	0.37
R.SFSQHR.T	58	0.002
K.DLEALLNSK.E	63	0.001
R.LADALQELR.A	82	8.7e-006
K.LEAALGEAKK.Q	49	0.023
K.QLQDEMLR.R	44	0.064
R.KLLEGEER.L	63	0.00087
R.LVEIDNGKQR.E	56	0.0039
R.TLEGELHDLR.G	53	0.0064
K.LRDLEDLAR.E	57	0.0021
R.VAVEEVDEEGK.F	71	0.0001
R.LKDLEALLNSK.E	70	0.00011
K.AAYEALGDARK.T	72	6.7e-005
R.SGAQASSTPLSPTR.I	62	0.00075
R.AQHEDQVEQYK.K	56	0.0034
K.NIYSEELRETK.R	58	0.0014
R.TVLCGTCGQPADK.A	73	5.4e-005
R.IDLSAQLSQLK.Q	70	0.00011
R.TAPINSTGEEVAMR.K	49	0.015
R.AQHEDQVEQYK.E	63	0.00057
R.SVGGSGGSGFDNLVTR.S	118	1.3e-009
R.VAVEEVDEEGKFVR.L	77	1.8e-005
R.TLEGELHDLRGQVAK.L	55	0.003
R.IRIDSLSAQLSQLK.Q	100	7.4e-008
R.NSNLVGAAHEELQQR.I	83	4.1e-006
R.ITESEEVVSR.E	58	0.0028

Tabella 1

E' riportata la lista dei peptidi triptici derivati dalla digestione di lamina A/C identificati tramite analisi LC-MS/MS. La scansione degli spettri MS/MS e' stata fatta utilizzando il motore di ricerca Mascot. Sono riportati la sequenza dei peptidi, lo *score*, e l' expectation value.

Gli spot sono stati excisi dal gel manualmente e la proteina e' stata digerita in gel con trispina (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI, USA). In breve, i campioni sono stati lavati con acetonitrile, asciugati sotto vuoto e digeriti con 12.5 ng/μL di tripsina a 37 °C overnight. Dopo la digestione, i peptidi sono stati estratti con 3 cambi di acetonitrile/0.1% acido formico (uno ogni 20 min), portati a secco sotto vuoto, risospesi in 10 μL di 0.1% ac formico e analizzati con LC-MS/MS, LCQ XP (Thermo Electron, San José, CA) interfacciato con nano-LC system 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e una colonna Zorbax 300SB C18, 3,5 μm, 150mm x 75 μm (Agilent), con gradiente lineare di acetonitrile/0.1% ac formico da 5% to 40% in 30 min.

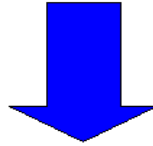
Sequenza Lamina A

```

1 metpsqrrat rsgaqasstp lsptritrly ekedlqelnd rlvayidrvr sletenaglr
61 lriteseevv srevsgikaa yeaelgdark tldsvakera rlqlelskvr eefkelkarn
121 tkkegdliaa qarlkdleal lnskeaalst alsekritleg elhdrlrgqva kleaalgeak
181 kqlqdemlrr vdaenrlqtm keeldfqnkni yseelretkr rhetriveid ngkqrefesr
241 ladalqelra qhedqveqyk kelektsyak ldnarqsaer nsnlvgaah eiqgsrivid
301 slsaqlsqli kqlaakeakl rdledslare rdtsrllae keremaemra rmqgqldeyq
361 elldiklald meihayrkll egeeerlrle psptsqrsrg rasshssqtq gggsvtkkrk
421 lestesrssf sqhartsgrv aveevdeegk fvrlrnksne dqsmgrwqik rqnqddpilt
481 yrfpkftlk agqvvtiwaagagathsppt dlvwkaqntw gcgnsrltal instgeevam
541 rklvrvvtvv eddededgdd llhhhgshc sssgdpaeyn lrsrtvlcgt cgpqadkasa
601 egsqaqvqgp issgssassv tvtrsyravq gsggsgfdn lvtrsyllgn ssprtqspqn
661 csim
    
```

Ser301
qsriridslsaq

Ser404
rsrgrasshss



RXRXXS/T ψ

Motif Scan Graphic Results: LAMIN_A

Basophilic serine/threonine kinase group (Baso_ST_kin)

Akt Kinase

Gene Card [AKT1](#)

Site	Score	Percentage	Sequence	SA
S404	0.4608	0.128 %	RSRGRASSHSSQSQG	1.016

Akt Kinase

Gene Card [AKT1](#)

Site	Score	Percentage	Sequence	SA
S301	0.4795	0.174 %	QSRIRIDSLSAQLSQ	0.401

Fig 2

2) Interazione tra Akt e lamina A

In base ai risultati precedenti, e' stato condotto un esperimento di co-immunoprecipitazione per verificare se esiste un' interazione tra Akt e le lamine in vivo. Lisati nucleari di cellule C2C12 sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con anticorpo anti-lamina A/C. Il pellet ottenuto e' stato separato mediante SDS-PAGE, trasferito su membrana di PVDF e rivelato con l'anticorpo anti-Akt. Nella figura 3 si osserva la presenza della chinasi nell'immunoprecipitato di lamina A/C, indicando che le due proteine interagiscono in vivo. Questo risultato e' confermato dalla presenza delle lamine nel pellet ottenuto dopo immunoprecipitazione con anti-Akt (Fig.3). E' importante osservare che l'anticorpo anti-Akt fosfosubstrato riconosce le lamine nel pellet di anti-Akt, indicando che la lamina A/C associata ad Akt e' fosforilata nel motivo riconosciuto dall'anticorpo.

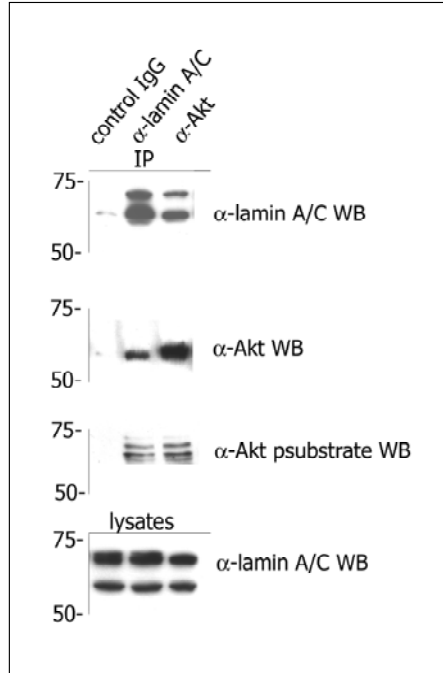


Fig 3

a) Immunoprecipitati di anti-lamina A/C (α -lamin A/C IP) e di anti-Akt (α -Akt IP) endogeni da lisati nucleari (2 mg) di C2C12, sono stati rivelati con anti-Akt fosfosubstrato (α -psubstrate WB) e successivamente con anti-Akt e anti-Lamina A/C.

3) Fosforilazione in vitro delle lamine A da parte di Akt

Avendo confermato che Akt e le lamine A si associano in vivo in nuclei di cellule C2C12, e' stata successivamente valutata la capacita' di Akt ricombinante attivo di fosforilare le lamine in vitro. A tale scopo, a causa della bassa efficienza di trasfezione delle cellule C2C12, sono state utilizzate cellule HEK293T, la cui efficienza di trasfezione e' circa il 60-70% con la metodica del Ca-fosfato. Cellule HEK293T sono state trasfettate con il plasmide pCI-flag-LMNA, che esprime la lamina A e il suo precursore, prelamina A, fuse con la sequenza flag. Il lisato cellulare e' stato immunoprecipitato con un anticorpo monoclonale (M2) diretto contro la sequenza flag, e il pellet contenente le lamine e' stato sottoposto a fosforilazione in vitro in presenza di Akt ricombinante attivo e di $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Le proteine fosforilate sono state separate mediante SDS-PAGE, trasferite su membrana di nitrocellulosa, e rivelate per mezzo di autoradiografia. La figura 4 mostra che la presenza di Akt ricombinante aumenta sensibilmente la fosforilazione delle lamine A, confermando l'ipotesi iniziale. Successivamente, la banda radioattiva relativa alle lamine A e' stata excisa dalla membrana, e utilizzata per l'analisi dei fosfoaminoacidi. I peptidi ottenuti sono stati separati tramite elettroforesi ad alto voltaggio, e rivelati per autoradiografia. A fianco del campione e' stata fatta correre una miscela di fosfoaminoacidi utilizzati come standard di riferimento. La figura 4 mostra che, mentre non si osserva alcun aumento di

radioattività' in corrispondenza dei residui di fosfotreonina e fosfotirosina, c'è un chiaro incremento in corrispondenza dei residui di fosfoserina. Questo è in accordo con il risultato della scansione con l'algoritmo *scansite* (Fig 2), che indica come siti putativi di fosforilazione più probabili due residui di serina, Ser301 e Ser404. L'algoritmo *scansite* si basa sulla ricerca del motivo r-x-r-x-x-s/t-ψ, dove la presenza dei residui di arginina in posizione -5 e -3 e del residuo aminoacidico idrofobico in posizione +1, rispetto al residuo fosforilato, è considerata essenziale per la fosforilabilità da parte di Akt. Effettivamente, entrambi i residui, Ser301 e Ser404, sono inseriti in un motivo che soddisfa i requisiti esposti. Inoltre entrambi i siti sono altamente conservati nella scala evolutiva, come sottolineato dallo stesso algoritmo.

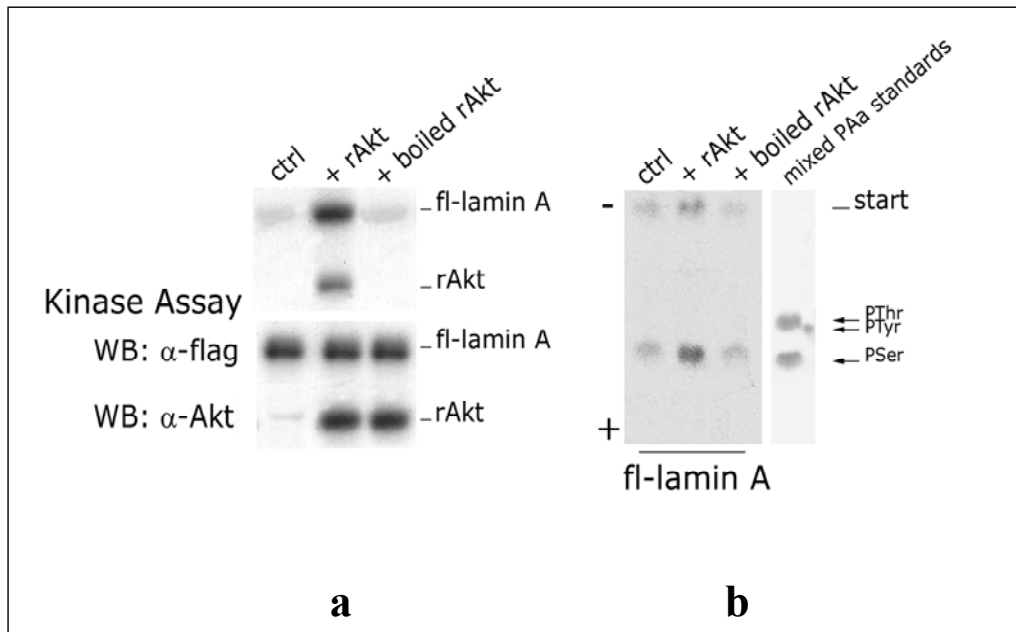


Fig 4

Cellule HEK293T sono state transfettate con il plasmide pCI-flag-LMNA, che esprime le lamine A, e i lisati immunoprecipitati con anti-flag (fl-lamin A). I pellet sono stati sottoposti a fosforilazione in vitro in presenza di Akt ricombinante attivo (rAkt) e γ 32 P-ATP. a) Successivamente, le proteine sono state risolte mediante SDS-PAGE, trasferite su membrana di nitrocellulosa e autoradiografate (Cyclone storage phosphor system. Packard). Come controllo negativo, un campione e' stato incubato con rAkt inattivato per denaturazione al calore (boiled rAkt). Successivamente, il filtro e' stato rivelato con anti-flag per controllare l'efficienza dell'immunoprecipitazione. b) Un filtro ottenuto in duplicato e' stato sottoposto a digestione con tripsina seguita da elettroforesi su carta ad alto voltaggio a pH 1.9 per l' analisi dei fosfopeptidi. Come standard di riferimento, una miscela di fosfoaminoacidi e' stata corsa in parallelo e colorata con ninidrina.

3) Identificazione del sito di fosforilazione

Su queste basi, peptidi che riproducono i due motivi Ser301 e Ser404 sono stati sintetizzati e utilizzati in un saggio di fosforilazione in vitro, in presenza di Akt ricombinante, utilizzando come controllo positivo il peptide substrato di Akt, cross-tide, disponibile commercialmente (Sigma Aldrich).

Il risultato indica che entrambi i peptidi possono essere fosforilati da Akt, almeno in vitro, anche se il peptide Ser404 sembra essere un substrato migliore del peptide Ser301, ad entrambe le concentrazioni utilizzate (fig 5).

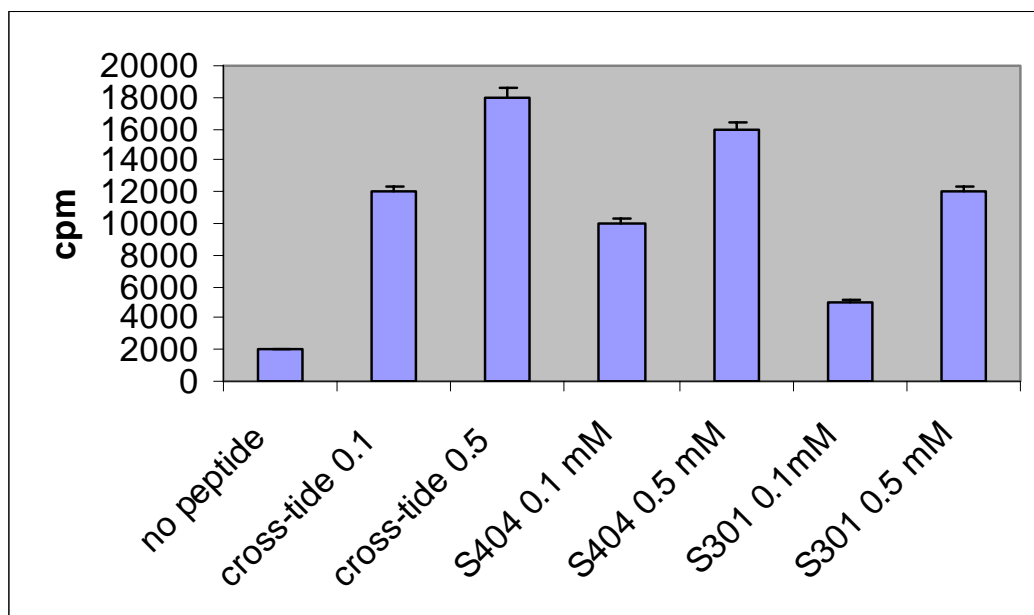


Fig 5

Il peptide cross-tide o i peptidi Ser301[QSRIRIDSLSAQLSQ(NH₂)] e Ser 404 [RSRGRASSHSQTQG(NH₂)] sono stati fosforilati in vitro in presenza di Akt ricombinante attivo (rAkt) e $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. I valori sono espressi in cpm.

Pertanto, entrambi i residui sono stati mutagenizzati per sostituzione della serina con l' amminoacido non fosforilabile alanina. Le lamine wild type o mutanti flag-lamina A S301A, flag-lamina A S404A, o doppio mutante flag-lamina A S404A/S301A sono state espresse in cellule HEK293T, immunoprecipitate con anticorpo anti-M2 e fosforilate in vitro in presenza di Akt ricombinante attivo e di $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Le proteine sono state analizzate in SDS PAGE e la fosforilazione evidenziata per autoradiografia.

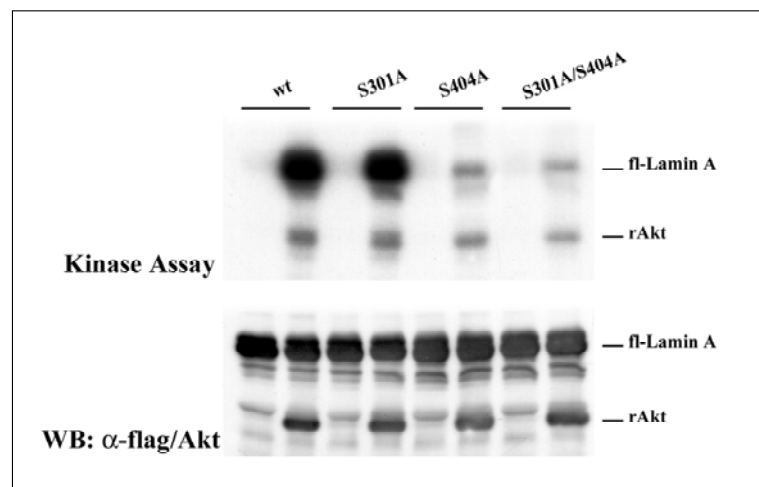


Fig 6

Cellule HEK293T sono state trasfettate con flag-lamina A wild type o con i mutanti flag-lamina A S301A, flag-lamina A S404A, e con il doppio mutante flag-lamina A S404A/S301A, sottoposte a immunoprecipitazione con anti-flag, fosforilazione in vitro e autoradiografia come descritto per la figura 4a. Successivamente, il filtro e' stato rivelato con anti-Akt e anti-flag.

Come si vede nella figura 6, la lamina A Ser301Ala e' fosforilata da Akt con la stessa intensita' della proteina wild type, mentre l'espressione della lamina A Ser404Ala ne previene quasi completamente la fosforilazione, indicando la Ser404 come il sito principale di fosforilazione.

Questa prima serie di risultati consente di concludere che le lamine A sono substrato di Akt, che le fosforila in posizione S404. Tuttavia, i risultati presentati in questa prima parte, non forniscono alcuna indicazione sul ruolo fisiologico della fosforilazione delle lamine A da parte di Akt in vivo. Percio', in collaborazione con il Dr. Oriano Marin, del Dipartimento di Chimica Biologica di Padova, e' stato sintetizzato il peptide GRASpSHSSQTQGGC, contenente il residuo Ser404 fosforilato. Tale fosfopeptide e' stato purificato ed utilizzato come antigene per produrre un fosfoanticorpo, in grado di riconoscere le lamine A fosforilate nel sito Ser404. Per dimostrare la specificita' dell'anticorpo anti-fosfolamina S404 (pS404), cellule HEK293T sono state co-trasfettate con Akt attivo (myr-Akt) insieme a lamina wild type, lamina S404A o a lamina S301A, e i lisati sottoposti a immunoprecipitazione con anticorpo anti-M2. Le proteine sono state analizzate in SDS PAGE e trasferite su PVDF, e la membrana e' stata incubata con anticorpo anti-pS404. Il risultato indica chiaramente che il campione in cui e' presente lamina wild type o mutata sul residuo Ser 301 e' riconosciuto dall'anticorpo. Come ulteriore controllo, una membrana ottenuta in duplicato e' stata rivelata con l'anticorpo anti-pS404, preincubato con il fosfopeptide

GRASpSHSSQTQGGC. Tale preincubazione annulla completamente il segnale, confermando la specificita' dell'anticorpo (fig 7).

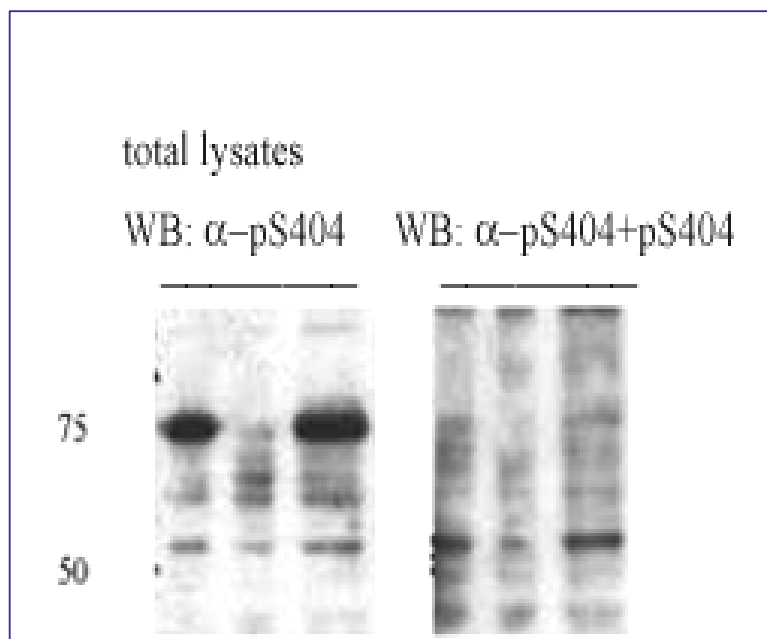


Fig 7

Il peptide Ser 404 purificato, nella sua forma fosforilata [GRASpSHSSQTQGGC] e' stato utilizzato come antigene per la produzione di un anticorpo policlonale di coniglio contro la forma fosforilata sul residuo S404 delle lamine A. Cellule HEK293T sono state co-trasfettate con il plasmide caax-Akt, codificante per una forma costitutivamente attiva di Akt, insieme a lamina A wilde type (lane 1), lamina A S404A (lane 2), lamina A S301A. Immunoprecipitati anti-flag, corsi in duplicato, sono stati rivelati con anti-fosfolamina pS404 (α -pS404, pannello a sinistra) o con anti-fosfolamina pS404 preincubato con il fosfopeptide Ser 404 (α -pS404+pS404, pannello a destra).

5) Akt e fosforilazione delle lamine A in vivo

Successivamente, cellule C2C12, mantenute per 24 ore in assenza di siero, sono state stimulate con insulina, noto attivatore fisiologico della via di segnale PI3-K/Akt. I lisati cellulari sono stati separati mediante SDS-PAGE e sottoposti ad analisi western blotting per verificare l'efficacia della stimolazione sull'attivita' di Akt.

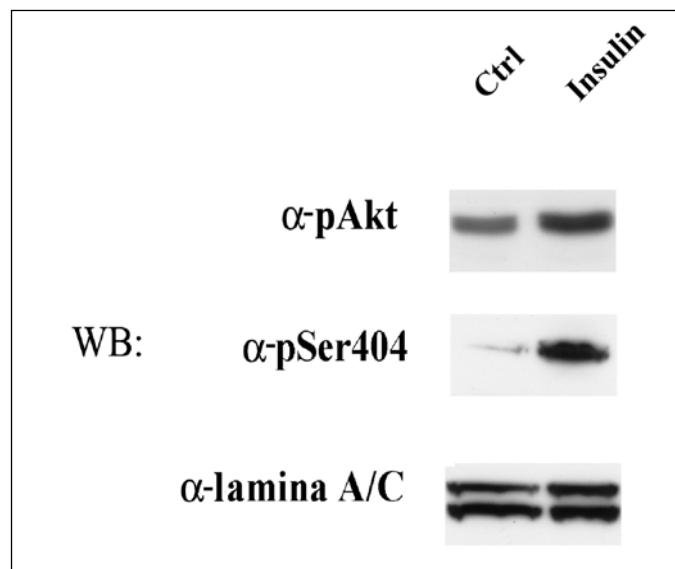


Fig 8

Cellule C2C12 sono state mantenute in assenza di siero per 24 ore prima del trattamento con insulina 0.4 μ M per 1 ora. I lisati cellulari (100 μ g) sono stati separati e rivelati con anti-fosfolamina pS404 (α -Ser404) e, successivamente, con anti-Akt pS473 (α -pAkt) per verificare l'attivazione di Akt in risposta all'insulina.

L'incubazione con anti-lamina A/C conferma l'uniformita' della carica proteica

La figura 8 mostra come il trattamento con insulina non solo e' in grado di attivare Akt, come dimostrato dalla risposta all'anticorpo anti-pS473. Ma, ancora piu' importante, in seguito all'attivazione di Akt si osserva un deciso incremento della fosforilazione delle lamine A sul residuo S404, rilevabile grazie all'anticorpo anti-pS404. Questo risultato permette di concludere che la fosforilazione delle lamine A da parte di Akt puo' essere considerato un evento fisiologico, poiche' e' stato indotto da un noto attivatore della via PI 3-chinasi/Akt.

La famiglia delle chinasi AGC, a cui Akt appartiene, insieme a SGK, MSK, p70S6K, PKC, PKA (Coffer et al.,1991), e' caratterizzata da un' elevata omologia di sequenza all'interno del dominio catalitico e, di conseguenza, nelle sequenze consenso sui rispettivi substrati. Si tratta infatti di chinasi basofiliche, che fosforilano cioe' residui di serina o treonina situati al C-terminale di un cluster di amminoacidici basici. In particolare, le chinasi SGK hanno alcuni substrati comuni ad Akt, hanno un motivo di fosforilazione sovrapponibile, e hanno una distribuzione intracellulare sia citosolica che nucleare, analogamente ad Akt. E' quindi fondamentale verificare a carico di quale di queste chinasi sia la fosforilazione delle lamine A. Per questo motivo, SGK wild type o privo di attivita' chinastica e' stato espresso in cellule HEK293T: L' analisi delle fosfolamina pS404 dimostra che questa chinasi non interviene nel meccanismo di fosforilazione delle lamine indotto da insulina (risultato non mostrato). Ma la conferma definitiva e' stata ottenuta grazie alla

inibizione dell' espressione di Akt1 in cellule C2C12 utilizzando specifici shRNA. Infatti, la fosforilazione delle lamine A e' stata analizzata in western blotting con l'anticorpo anti-pSer404: in presenza di bassi livelli di Akt1, e di conseguenza di una bassa attivazione in risposta a stimolo. In queste condizioni, la fosforilazione delle lamine A e' completamente prevenuta.

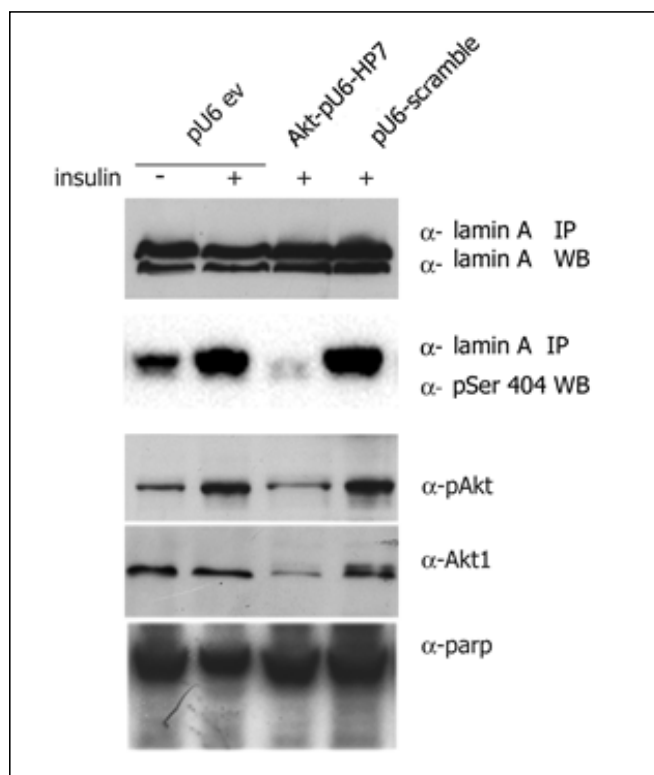


Fig 9

Cellule C2C12 sono state trasfettate per 48 ore con il plasmide pu6 privo di inserto (ev), o contenente siRNA specifici per la sequenza di Akt1 murino, o una sequenza "scramble" di controllo, con il kit Cell Line Nucleofector V Amaxa Nucleoporator. Le cellule sono state deprivate di siero per 16 ore prima del trattamento con insulina 0.4 μ M per 1 ora. La lamina endogena e' stata immunoprecipitata e il filtro rivelato con anti-fosfolamina pS404 (pSer 404), poi con anti-lamina A/C. I lisati cellulari sono stati separati e rivelati con anti-Akt pSer473 (pAkt) e anti-Akt1, per valutare rispettivamente il grado di fosforilazione/attivazione e di espressione di Akt1 e quindi l'efficacia dei siRNA. La presenza di uguali quantita' della forma di peso molecolare 113 kDa della poli(ADP-riboso)polimerasi (α -parp) e l'assenza del prodotto di parziale proteolisi di 80 kDa dimostrano la integrita' delle cellule.

**Diversa fosforilazione delle lamine A ad opera di Akt, in mioblasti e
miotubi C2C12.**

Successivamente e' stato analizzato lo stato di fosforilazione delle lamine A in mioblasti C2C12 durante le diverse fasi del ciclo cellulare, oppure durante la crescita in terreno di differenziamento contenente 0.5% di siero di cavallo (FHS). In queste condizioni si puo' notare che, mentre la fosforilazione delle lamine A/C rimane costante, la fosforilazione del precursore prelamina A e' presente in cellule proliferanti, ma non in cellule in quarta giornata di differenziamento. Durante le fasi del ciclo cellulare, di nuovo la fosforilazione della lamina A/C rimane costante; al contrario, quella del precursore non raggiunge livelli monitorabili per la maggior parte del ciclo, per aumentare sensibilmente solo durante la transizione G2/M. Il livello di espressione della ciclina A e' stato dosato a conferma della progressione del ciclo cellulare (Fig.10).

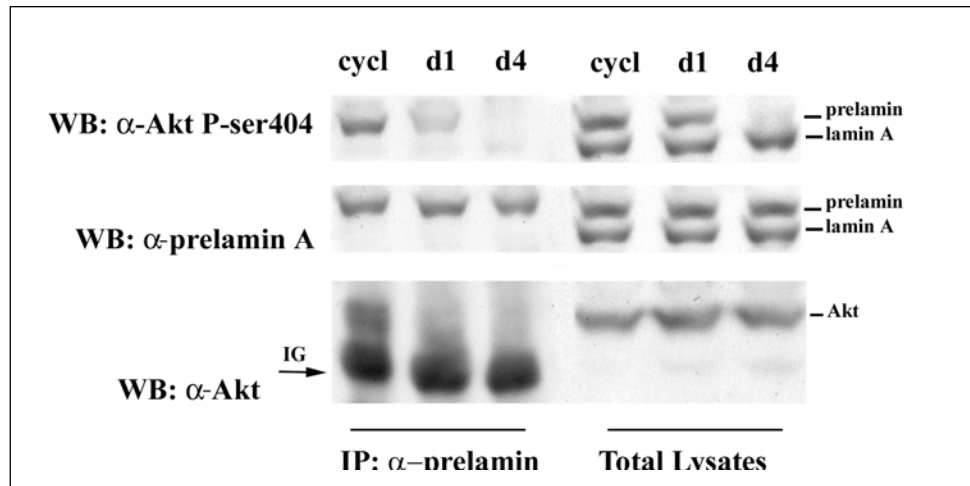


Fig 10 a

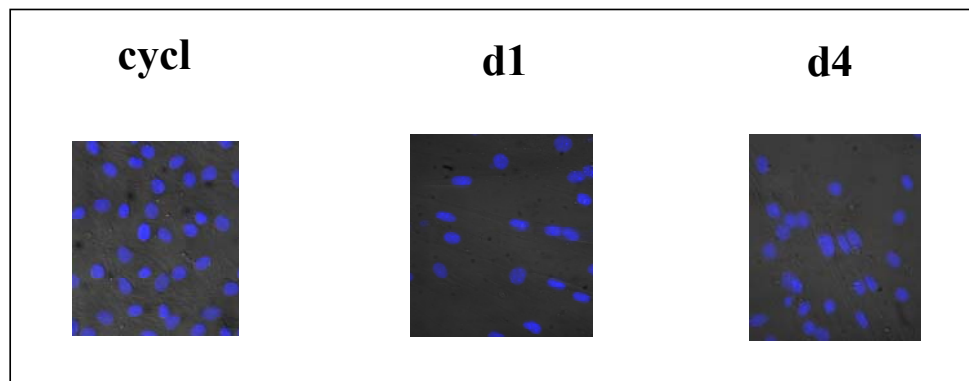


Fig 10 b

Cellule C2C12 coltivate in terreno di crescita contenente 10% FBS (cycl) oppure in terreno di differenziamento contenente 0.5% FBS per 1 giorno (d1) o 4 giorni (d4); a) i lisati cellulari sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con anti-prelamin A, i pellet sono stati separati e rivelati con anti-fosfolamina pSer404 e, successivamente, con anti-lamina A e anti-Akt. b) le cellule coltivate su vetrino coprioggetto sono state fissate con 4% paraformaldeide in PBS, e i nuclei colorati con DAPI. Sono visibili alcuni miotubi nel pannello d4.

7) Legame della prelamina A all'adattatore molecolare 14.3.3 γ

E' noto che la fosforilazione del motivo di consenso di Akt puo' creare un sito di legame per gli adattatori molecolari 14.3.3 (Brunet et al.,1999). Per valutare se anche la prelamina A, in seguito a fosforilazione, diventa un partner di legame degli adattatori 14.3.3, e' stato allestito un esperimento di co-immunoprecipitazione su estratti proteici di mioblasti ciclanti. Poiche' la famiglia 14.3.3 comprende ben 7 isoforme, solo parzialmente ridondanti, e' stato inizialmente utilizzato per l'immunoprecipitazione un anticorpo anti-14.3.3 diretto contro un epitopo comune a diverse isoforme. L'immunoprecipitato e' poi stato rivelato con un anticorpo specifico per l'epitopo C-terminale della prelamina, cioe' verso quella porzione presente solo nel precursore e successivamente eliminata attraverso una digestione parziale nel processo di maturazione della lamina A. La presenza della prelamina endogena nel pellet di anti-14.3.3 indica che le due proteine si associano in vivo (Fig 11) .

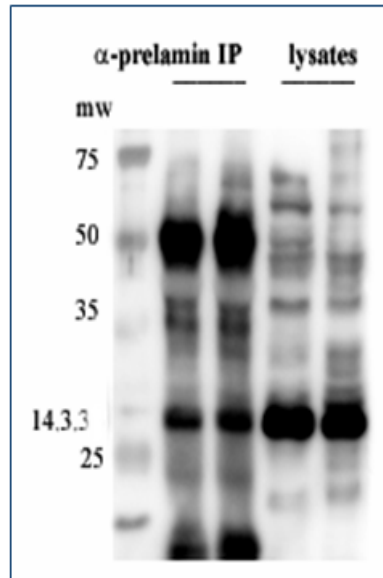


Fig 11

Lisati di cellule C2C12 (2.5 mg) sono stati immunoprecipitati in duplicato con anti-prelamina (C-terminale, Fong), separati insieme a lisati totali di controllo e rivelati con anti-14.3.3. E' indicata la banda corrispondente alla proteina 14.3.3.

Nei partner di 14.3.3 finora identificati, e' stata riconosciuta necessaria per l'associazione la presenza di un residuo di prolina in posizione +2. Il motivo Ser404 non ha questa caratteristica. Tuttavia, la ricerca di domini putativi di legame, attraverso l'algoritmo *scansite* ad alta stringenza, associa proprio a questo motivo lo *score* migliore (tavola 2). Questo puo' essere spiegato da risultati molto recenti, ancora in via di pubblicazione, che indicano che, in assenza della prolina in posizione +2, un residuo di serina o treonina possono vicariarne la funzione (LC Cantley, comunicazione personale).

Phosphoserine/threonine binding group (pST_bind)				
14-3-3 Mode 1			Gene Card YWHBZ	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
S404	0.4351	0.617 %	EERGRASSHSSQSGQQ	1.016

Tabella 2

La fosforilazione del residuo Ser 404 crea un dominio putativo di legame per le proteine 14.3.3

Diventa perciò indispensabile capire se l'associazione tra le due proteine sia un evento conseguente alla fosforilazione della prelamina da parte di Akt. Per questo motivo, estratti proteici di mioblasti ciclanti, mantenuti 24 ore in assenza di siero, e ottenuti con un tampone di lisi privo di inibitori di fosfatasi, sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-prelamina, poi il pellet è stato incubato con fosfatasi λ in buffer PPase, per defosforilare le proteine presenti nel pellet. L'efficacia della defosforilazione è stata verificata rivelando un'aliquota di campione con anticorpo anti-fosfoserina 404 (Fig 12.). Contemporaneamente, lo stesso saggio è stato ripetuto su un

lisato preparato in presenza di inibitori di fosfatasi, ed il pellet e' stato incubato come sopra, ma in assenza di fosfatasi λ . Al termine dell'incubazione, entrambi i pellet sono stati incubati con lisati totali di mioblasti C2C12 per 16 ore a 4° C. Infine, i pellet sono stati separati mediante SDS-PAGE ed e' stata analizzata la presenza della proteina 14.3.3 γ , cioe' dell'isoforma che, attraverso l'uso di un pannello di anticorpi specifici per le singole isoforme, e' stata riconosciuta come l'isoforma che si lega alla prelamina in vivo (risultato non mostrato). La fig 12 mostra che il legame tra la 14.3.3 γ e la prelamina nel campione defosforilato e diminuito in modo significativo, consentendo di concludere che la fosforilazione della prelamina sul residuo Ser 404 predispose la proteina al legame con 14.3.3 γ . Va inoltre osservato che la chinasi Akt presente nel lisato utilizzato per l'esperimento di pull-down e' attiva, e puo' quindi render conto della porzione di 14.3.3 associata a prelamina che residua nel pellet defosforilato. Questo risultato permette di attribuire all'evento di fosforilazione del precursore, mediato da Akt, un ruolo positivo nell' interazione con 14.3.3 γ .

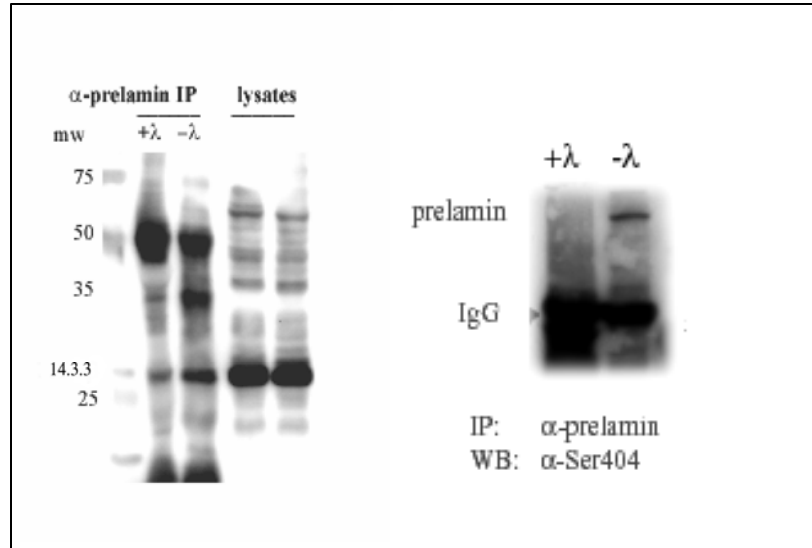


Fig 12

Cellule C2C12 sono state lisate in RIPA buffer completo oppure privo di inibitori di fosfatasi. 2.5 mg di lisato sono stati immunoprecipitati in doppio con anti-prelamina (C-terminale, Fong). Un pellet è stato incubato con λ -fosfatasi (50U, NEB) in buffer di defosforilazione per 30 minuti a 37°C, e il secondo è stato incubato in buffer di defosforilazione, ma in assenza di fosfatasi. Al termine dell'incubazione, i due pellet sono stati incubati con un lisato cellulare totale a 4°C. Infine, i pellet sono stati separati e rivelati con anti-14.3.3 γ . Il pannello di destra mostra il controllo dell'avvenuta defosforilazione della prelamina, ottenuto rivelando gli immunoprecipitati anti-prelamina con anti-fosfolamina pSer404 (α -Ser404).

Basandoci su questo risultato, abbiamo quindi ipotizzato che l'associazione della prelamina a 14.3.3 segua lo stesso andamento della sua fosforilazione. Perciò, l'interazione tra queste proteine è stata analizzata in mioblasti indotti a differenziare e in mioblasti trattati in modo da arricchire la popolazione in fase G2/M, cioè nel momento del ciclo cellulare in cui la fosforilazione della prelamina indotta da Akt è massima. La fig 13 dimostra la presenza di prelamina nell'immunoprecipitato anti-14.3.3 γ ottenuto da mioblasti ciclianti, ma non nell'immunoprecipitato ottenuto da mioblasti indotti a differenziare. Inoltre, l'associazione di prelamina e 14.3.3 in mioblasti in fase G2/M non solo correla perfettamente con l'andamento precedentemente osservato della fosforilazione della prelamina sul motivo di Akt, ma conferma anche un'osservazione pubblicata dal laboratorio di Piwnicka-Worms. Infatti, in una analisi proteomica di partner di legame di 14.3.3, le lamine di tipo A sono state identificate come interattori solo in cellule in fase G2/M del ciclo cellulare (Meek et al., 2004).

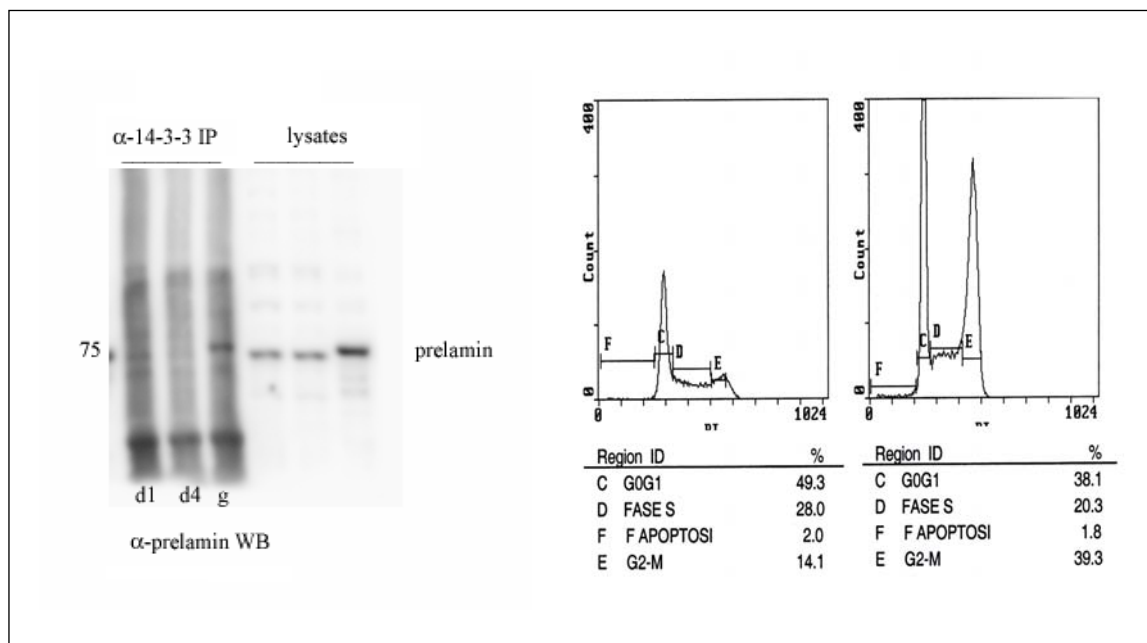
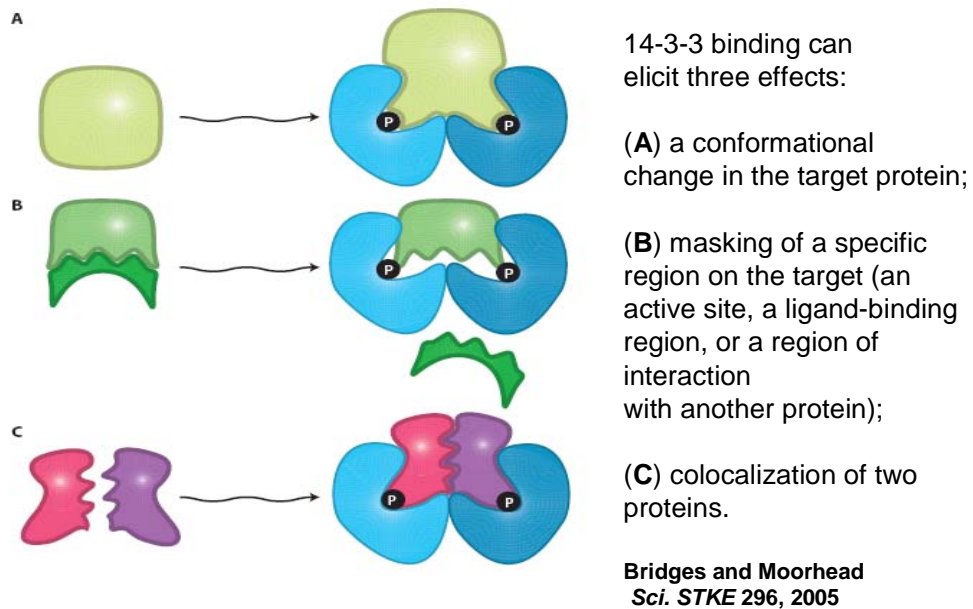


Fig 13

Fig. 13 Cellule C2C12 mantenute in terreno di crescita e trattate con roscovitina 50 μ M per 24 ore (g), oppure in terreno di differenziamento (0.5% FHS) per 1 giorno (d1) o 4 giorni (d4) sono state sottoposte a immunoprecipitazione con anti-14.3.3 e i pellet rivelati con anti-prelaminina (C-terminale, Fong). In parallelo, cellule provenienti dagli stessi campioni sono state fissate in etanolo 70% a freddo, colorate con ioduro di propidio e analizzate in citometria a flusso per identificare la percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Si puo' notare che il trattamento con roscovitina arricchisce la popolazione nella fase G2/M del ciclo cellulare (pannello a destra, 39,3%), mentre le cellule in terreno di differenziamento mostrano una bassa percentuale (pannello a sinistra, 14%) di popolazione in G2/M.

8) Analisi del ruolo fisiologico della fosforilazione della prelamina A da parte di Akt

Le proteine fosforilate e poi reclutate dalle 14.3.3 possono seguire destini diversi, associati ai diversi ruoli che le proteine 14.3.3 possono svolgere in vivo. Come riassunto nella schema 1 la proteina partner puo' andare incontro ad una redistribuzione intracellulare, dimostrata ad esempio nel caso di Foxo (Brunet et al.,1999), alla associazione/dissociazione con altre proteine, oppure alla ubiquitinazione e successiva degradazione, gia' dimostrata ad esempio per Mdm2/Hdm2 (Yoeli-Lerner et al., 2005). Ci siamo perciò chiesti quale potesse essere il destino della prelamina A dopo il reclutamento da parte di 14.3.3. Sapendo che il sito di fosforilazione Ser404 e' adiacente al segnale di localizzazione nucleare della proteina, e che la fosforilazione in Ser403/Ser404 e' necessaria per l'import nucleare della proteina neosintetizzata (Leukel et al.,1995), abbiamo ipotizzato inizialmente che la proteina possa subire una rilocalizzazione nel citoplasma, dove verrebbe segregata.



Schema 1

Effects elicited by 14.3.3

Tuttavia, la distribuzione subcellulare delle lamine A, osservata tramite microscopia a fluorescenza con un anticorpo specifico diretto contro l'epitopo N-terminale, indica che la localizzazione di queste proteine non subisce variazioni in seguito a inibizione di Akt ne' con inibitori della via PI 3-chinasi ne' con l'espressione di mutanti di Akt privi di attivita' chinastica (non mostrato). Al contrario, in cellule in cui l'attivita' di Akt e' stimolata dal trattamento con insulina, pur rimanendo la distribuzione globale delle lamine A inalterata, l'analisi della sola prelamina A con un

anticorpo specifico per l'epitopo C-terminale porta ad un risultato sorprendente: infatti, in seguito all'attivazione di Akt, la marcatura scompare quasi completamente, suggerendo che la prelamina in queste condizioni sia down-regolata (Fig 14).

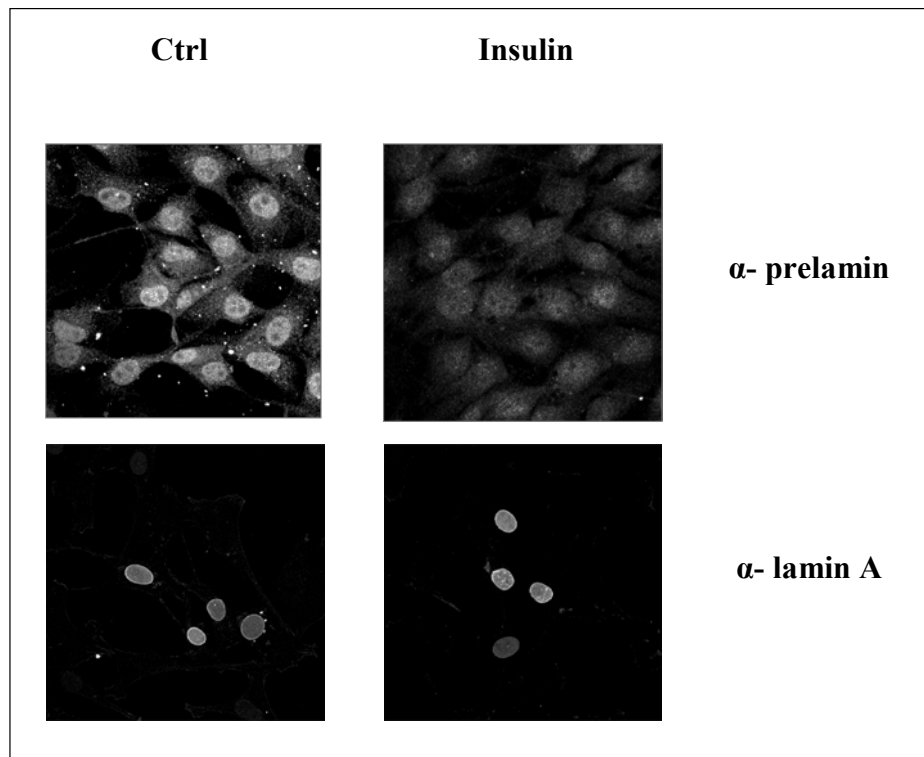


Fig 14

Cellule C2C12 sono state seminate su vetrino coprioggetto e sono state deprivate di siero per una notte prima del trattamento con insulina ($0.4 \mu\text{M}$ per 1 ora). Le cellule sono state fissate e incubate con anti-prelamina A(C-terminale, Fong) oppure con anti-lamina A/C (N-terminale, Santa Cruz) come indicato, e con un anticorpo secondario coniugato a FITC.

L' esperimento e' quindi stato ripetuto attraverso l' analisi western blotting, confermano che quando Akt e' attivato, la quantita' di prelamina cala fino a scomparire. Poiche' sappiamo che la prelamina va incontro ad un processo di maturazione, che porta alla formazione di lamina A, e' possibile che la fosforilazione della prelamina da parte di Akt attivi o acceleri questo processo. Se cosi' fosse, pero', contemporaneamente alla scomparsa della banda di 75 kDa corrispondente alla prelamina, si dovrebbe osservare un aumento di lamina A a 72 kDa, che invece non e' visibile ad esempio dopo trattamento con insulina (Fig 15).

Avendo escluso che la prelamina venga ridistribuita o maturata a lamina A, abbiamo ipotizzato che il drammatico calo di prelamina sia imputabile ad una sua accelerata degradazione. Abbiamo percio' ipotizzato che la prelamina, dopo essere stata fosforilata da Akt e reclutata dalla 14.3.3 γ , venga ubiquitinata e indirizzata alla degradazione proteasomica. Tuttavia, l' inibitore del proteasoma MG132 non e' in grado di prevenire la diminuzione di prelamina ne' in cellule controllo ne' in cellule overesprimenti Akt (Fig16). Ugualmente inefficace risulta l' inibitore delle caspasi Zvad (Fig16), utilizzato in quanto e' noto che le lamine A sono substrato dalla caspasi 6 durante l' apoptosi (Ruchaud et al., 2002). La preincubazione con inibitori della degradazione lisosomiale, come E64 o cloroquina, invece, e' in grado di ripristinare i livelli iniziali di prelamina sia in cellule wild type che in

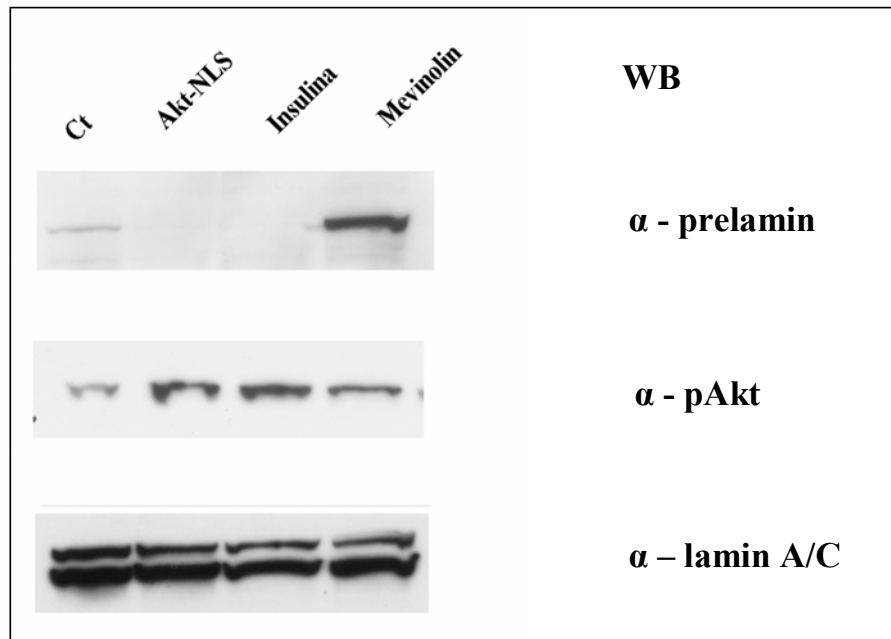


Fig 15

Cellule C2C12 sono state mantenute per 72 ore in terreno di crescita (Ct). Dove indicato, le cellule sono state deprivate di siero per una notte prima del trattamento con insulina (0.4 μ M per 1 ora), oppure sono state infettate con un adenovirus che codifica per Akt1 fuso ad una sequenza di localizzazione nucleare (Akt-NLS). Infine, 80 μ g di lisati totali sono stati rivelati con anti-prelamina, oppure con anti-Akt pSer473, oppure con anti-lamina A/C, come indicato. Come riferimento di peso molecolare, e' stato caricato un lisato proteico di cellule C2C12 trattate per 16 ore con l' inibitore delle farnesil-transferasi Lovastatin (25 μ M) che, bloccando il processo di maturazione, provoca accumulo di prelamina (mevinolin).

cellule in cui la via PI 3-chinasi/Akt e' stata attivata (Fig16). Questa importante osservazione permette di concludere che la fosforilazione della prelamina sul sito S404 crea un domino di associazione per gli adattatori 14.3.3, il cui legame indirizza la prelamina verso una via degradativa lisosomiale, limitatamente alla fase G2/M del ciclo cellulare. In questa

fase, la lamina, insieme all'involucro nucleare, va incontro a disassemblaggio, poiché la cellula si prepara a dividersi. E' quindi ipotizzabile che la prelamina, che in questo momento della vita della cellula non può essere maturata a lamina A, venga indirizzata verso una via degradativa, per poi riprendere il suo ruolo di precursore della lamina A al termine della mitosi.

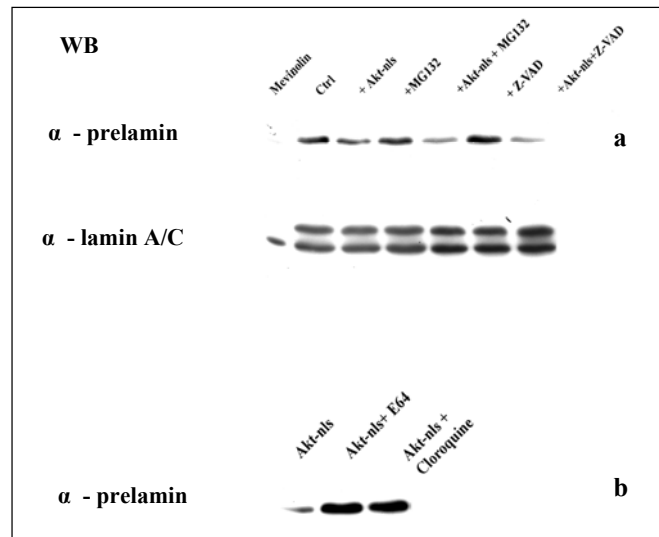


Fig 16

Cellule C2C12 in terreno di crescita sono state mantenute per 72 ore in terreno di crescita (Ctrl), o infettate con un adenovirus che codifica per Akt1 fuso ad una sequenza di localizzazione nucleare (Akt-NLS), in duplicato. a) Dove indicato, un campione è stato trattato con l'inibitore del proteasoma MG132 (1 ora, 50 μ M), con l'inibitore delle caspasi ZVAD (1 ora, 20 μ M), con l'inibitore delle farnesil-transferasi mevinolin (16 ore, 25 μ M), b) oppure con gli inibitori dei lisosomi E64 (16 ore, 25 μ M) e cloroquina (16 ore, 50 μ M). 100 μ g di lisati totali sono stati rivelati con anti-prelamina, oppure con anti-lamina A/C, come indicato.

DISCUSSIONE

In questa tesi sono state descritte l'identificazione di un substrato di Akt, la lamina di tipo A, e la regolazione della loro stabilità tramite il processo fosforilativo. Il lavoro si è basato sull'applicazione di una specifica strategia sperimentale, mirata all'identificazione di nuovi substrati di Akt nel nucleo, che integra la separazione bidimensionale delle proteine nucleari con il riconoscimento del motivo di fosforilazione di Akt da parte di uno specifico anticorpo anti-fosfosubstrato. In particolare, per aumentare l'efficienza del sistema, sono state utilizzate cellule C2C12 infettate con un adenovirus codificante per una forma di Akt fusa ad una sequenza di localizzazione nucleare. Per contro, come controllo negativo, sono state utilizzate proteine nucleari dello stesso tipo cellulare, infettato con un adenovirus che codifica siRNA di Akt1. Le proteine differenzialmente fosforilate sono state poi identificate attraverso spettrometria di massa.

La ricerca di substrati di Akt nel nucleo si basa su due presupposti: il primo è che la presenza e l'attività di Akt in questo compartimento subcellulare sono ben documentate (Kunkel et al., 2005), il secondo è che esistono proteine, anche se poche, la cui fosforilazione da parte di Akt è stata documentata come un evento che ha luogo nel nucleo (Brunet et al., 1999).

La ricerca è stata condotta seguendo un percorso validato, per eliminare la possibilità di artefatti che hanno portato, negli ultimi anni, alla pubblicazione

da parte di alcuni laboratori di risultati conflittuali e non successivamente confermati (Manning e Cantley, 2007). I risultati presentati comprendono la dimostrazione dell' associazione in vivo delle proteine Akt e lamine A, della loro fosforilazione in vitro, la identificazione mediante mutagenesi del sito di fosforilazione e lo studio del ruolo fisiologico di questo evento, assistito dalla produzione di un anticorpo diretto contro l'epitopo fosforilato da Akt sulle lamine A, Ser404.

Le lamine di tipo A sono proteine dei filamenti intermedi di tipo V, responsabili della formazione della lamina nucleare, al di sotto della membrana nucleare interna. La fosforilazione delle lamine A e' un processo molto importante sia durante l'interfase che durante la mitosi, quando sia l' involucro nucleare sia la lamina nucleare vengono disassemblati.

Nelle cellule in mitosi, le chinasi ciclina-dipendenti mediano la fosforilazione delle lamine A, B, e C. Questo evento segue la fosforilazione delle lamine ad opera della PKC nei nuclei in interfase. Durante l'interfase, la fosforilazione della lamina A/C è stata osservata nei fibroblasti quiescenti, in seguito a trattamento con insulina. E' stato inoltre caratterizzato (Martelli et al., 2004) il sito di interazione molecolare tra la lamina A e la proteina chinasi C alfa, situato nel dominio della lamina A a valle dell'amminoacido 499. La modulazione della fosforilazione della lamina A/C, è stata anche riportata in cellule infettate dal citomegalovirus murino. Tuttavia, in condizioni

fisiologiche, non è stato ancora chiarito il ruolo della fosforilazione della lamina A/C nei nuclei interfasicci.

In questo contesto, i risultati presentati costituiscono un importante passo avanti nella comprensione del meccanismo molecolare alla base del disassemblaggio della lamina nucleare all' inizio della mitosi. Infatti, i risultati ottenuti dimostrano che, mentre la fosforilazione delle lamine A/C sul motivo di Akt rimane costante durante tutte le fasi del ciclo cellulare, non così la fosforilazione del precursore, prelamina A.

La prelamina A, una proteina di 74/75 kDa caratterizzata dalla presenza di un residuo CAAX alla sua estremità C-terminale, subisce una serie di complesse modificazioni post-traduzionali quali la farnesilazione sul residuo di cisteina della coda CAAX, un primo taglio proteasico in posizione 662 ad opera di una metalloproteasi zinco-dipendente ZMPSTE24, una metilazione ed infine un ultimo taglio sempre ad opera dello ZMPSTE24, che porta alla rimozione degli ultimi 18 amminoacidi, con formazione di lamina A matura (72 kDa).

E' stato ipotizzato che il processo di maturazione della prelamina A abbia un significato funzionale, in quanto potrebbe influenzare la capacità della prelamina stessa di interagire con altre proteine o con la cromatina. Nonostante l'intenso lavoro svolto negli ultimi anni in questo campo, mancano ancora evidenze sperimentali a supporto di tale ipotesi funzionale.

E' stato inoltre suggerito un ruolo preponderante del precursore della lamina A nell'organizzazione dei domini cromatinici, in seguito all'osservazione che

le mutazioni a carico della lamina A, capaci di interferire con il processo di maturazione della pre-lamina A, causano drastici cambiamenti nei territori eterocromatici, in cellule di pazienti laminopatici (Goldman et al., 2004; Columbaro et al., 2005; Liu et al., 2005). Appare quindi possibile, un legame tra i processi di maturazione della prelamina A (quali farnesilazione, taglio da endoproteasi e fosforilazione) e l'organizzazione dell'eterocromatina. L'osservazione che il precursore della lamina A è fosforilato da Akt in modo ciclo-dipendente, limitatamente alla fase G2/M, potrebbe avallare l'ipotesi di un suo effetto sull'organizzazione della cromatina, basato soprattutto sull'osservazione, riportata di recente (Hu et al. 2005), che il fattore nucleare acinus, implicato nella condensazione della cromatina in nuclei apoptotici, è in grado di regolare il grado di compattazione della cromatina in seguito a fosforilazione da parte di Akt. Tuttavia, nel corso di questo studio, non sono stati osservati effetti a carico della cromatina imputabili alla fosforilazione da parte di Akt. E' stato però possibile stabilire che il dominio Ser404, in seguito alla fosforilazione, diventa un buon dominio di legame per l'adattatore molecolare 14.3.3 γ , in accordo con quanto già riportato per altri substrati di Akt. Sono state quindi esaminate tutte le possibili strade verso cui la fosforilazione e successiva associazione a 14.3.3 può indirizzare un substrato. Tuttavia, non sono state osservate modificazioni né della maturazione né della distribuzione intracellulare della prelamina, nonostante la posizione della serina 404 in prossimità del NLS potesse far sospettare tale meccanismo. E'

però emerso chiaramente che la fosforilazione è in grado di modificare la stabilità della proteina. In particolare, l'uso di inibitori dei diversi meccanismi degradativi, ubiquitinazione e degradazione a carico del proteasoma, degradazione a carico di calpaine, degradazione a carico degli enzimi lisosomiali, ha permesso di individuare la via degradativa lisosomiale quale principale meccanismo degradativo.

La fosforilazione è massima in corrispondenza della fase G2/M del ciclo cellulare, cioè nel momento in cui la lamina sta per essere disassemblata, e la cellula non necessita di precursore per la produzione di lamina A matura, perciò indirizza la prelamina verso una via degradativa.

L'osservazione che Akt è in grado di regolare la stabilità della prelamina A, già importante in sé, potrebbe assumere un significato ancora più rilevante se associata al ruolo che la prelamina è sospettata di svolgere in alcune laminopatie. Infatti, mentre il ruolo strutturale per le proteine della lamina nucleare nel mantenimento dell'integrità del nucleo, specialmente nelle cellule muscolari, è noto da tempo, studi recenti suggeriscono un ruolo fondamentale anche nel regolare l'organizzazione della cromatina, l'attività trascrizionale, la traslocazione e il legame dei fattori di trascrizione (Maraldi et al., 2002; Zastrow e Wilson 2004; Maraldi e Lattanzi 2005).

In particolare, mutazioni a carico delle lamine A sono responsabili di numerose malattie ereditarie (Maraldi e Lattanzi 2005), quali la distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (Cenni, 2005).

E' interessante notare che i soli aspetti comuni finora identificati in cellule di pazienti Emery-Dreifuss caratterizzate da mutazioni delle lamina A, sono l'alterata fosforilazione delle lamine A e la disorganizzazione dei domini eterocromatici (Cenni et al., 2005; Maraldi et al., 2005). Il posizionamento dei territori cromosomici, in relazione al tipo cellulare e al differenziamento, è regolato dall'interazione dinamica delle proteine associate alla cromatina con l'involucro nucleare, che limita la mobilità delle regioni genomiche. L'eterocromatina periferica, strettamente associata all'involucro nucleare, è considerata inattiva a causa del suo basso contenuto in geni attivi e per la capacità di silenziare sequenze attive in seguito al loro reclutamento in questo dominio cromatinico. Le lamine nucleari sono in grado di legare il DNA nucleosomico e mediano l'attacco dell'eterocromatina periferica silente all'involucro nucleare. E' stato recentemente ipotizzato, nell'organizzazione dei domini cromatinici, un coinvolgimento soprattutto della prelamina A. E' perciò molto interessante la mutazione a carico dell' arginina 401, in posizione -3 rispetto al residuo fosforilato Ser404, riportata in un paziente affetto da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (Cenni et al., 2005). Poiche' l'arginina in posizione -3 e' un requisito fondamentale della fosforilabilita' di un substrato di Akt, questa osservazione ci permette di speculare che ci sia una relazione tra la mutazione alla base del fenotipo Emery-Dreifuss e la mancata fosforilazione della prelamina.

In conclusione, i risultati presentati in questa tesi permettono di affermare che:

- e' stato identificato un nuovo substrato nucleare di Akt, rappresentato dalle lamine di tipo A, prelamina A e lamine A/C;
- il sito di fosforilazione e' stato individuato a carico della serina 404, in un motivo canonico di fosforilazione di Akt altamente conservato;
- la fosforilazione avviene in vivo in risposta a stimoli fisiologici di Akt;
- limitatamente al precursore prelamina A, la fosforilazione e' ristretta alla fase G2/M del ciclo cellulare;
- la prelamina fosforilata si associa, durante la fase G2/M, all' adattatore molecolare 14.3.3.γ;
- tale associazione guida la degradazione proteolitica della prelamina a carico del sistema lisosomale;

oltre a rappresentare una osservazione originale per quel che riguarda la regolazione della prelamina, quest' ultimo risultato e' importante anche perche' rappresenta la prima evidenza sperimentale in cui una proteina fosforilata da Akt non viene indirizzata verso una via di ubiquitinazione e degradazione a carico del proteasoma, ma direttamente degradata attraverso il meccanismo lisosomale.

Infine, la presenza di mutazioni nel motivo di fosforilazione, riscontrate in pazienti affetti da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss, permette di ipotizzare un ruolo della stabilita' della prelamina A in questa patologia, aprendo nuove prospettive di indagine futura in un contesto dove unicamente

il ruolo strutturale della lamina nucleare, e non quello funzionale legato a fosforilazione, e' sempre stato oggetto di studio.

BIBLIOGRAFIA

- **Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R.** Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 1997;16(13):3797-804.
- **Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P.** Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. FEBS Lett. 1996;399(3):333-8
- **Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P.** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol. 1997;7(4):261-9.
- **Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA.** Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. J Biol Chem. 1997;272(50):31515-24.
- **Astoul E, Watton S, Cantrell D.** The dynamics of protein kinase B regulation during B cell antigen receptor engagement. J Cell Biol. 1999;145:1511-20.
- **Baldwin AS.** Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. J Clin Invest. 2001;107(3):241-6.
- **Bavelloni, A., Santi, S., Sirri, A., Riccio, M., Faenza, I., Zini, N., Cecchi, S., Ferri, A., Auron, P., Maraldi, N.M. and Marmioli, S.** Phosphatidylinositol 3-kinase translocation to the nucleus is induced by interleukin 1 and prevented by mutation of interleukin 1 receptor in osteosarcoma Saos-2 cells. J Cell. Sci 1999;112: 631 -640.
- **Bayascas JR, Alessi DR.** Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. Mol Cell. 2005;18(2):143-5.

- **Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tschlis PN**. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. Science. 1991;254(5029):274-7.
- **Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, Heesom KJ, Hers I, Fletcher LM, Cooke FT, Tavaré JM**. Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. J Cell Sci. 2004;117(Pt 25):5985-93..
- **Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC**. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(13):7421-6
- **Borgatti P., Martelli A.M., Bellacosa A., Casto R., Massari L., Capitani S., Neri L.** Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. FEBS Lett. 2000;477 :27-32.
- **Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54
- **Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA** Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends Biochem Sci. 2004;29(5):233-42.
- **Brennan P, Babbage JW, Burgering BM, Groner B, Reif K, Cantrell DA**. Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. Immunity. 1997;7(5):679-89.
- **Brognard J, Sierrecki E, Gao T, Newton AC**. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. Mol Cell. 2007;25(6):917-31.

- **Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell. 1999;96(6):857-68.
- **Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB.** 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. J Cell Biol. 2002;156(5):817-28.
- **Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME.** Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). Mol Cell Biol. 2001;21(3):952-65.
- **Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science. 1998;282(5392):1318-21.
- **Cenni V, Sirri A, Riccio M, Lattanzi G, Santi S, de Pol A, Maraldi NM Marmioli S.** Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. Cell Mol Life Sci 2003;60: 2710-2720.
- **Cenni V, Sabatelli P, Mattioli E, Marmioli S, Capanni C, Ognibene A, Squarzoni S, Maraldi NM, Bonne G, Columbaro M, Merlini L, Lattanzi G.** Lamin A N-terminal phosphorylation is associated with myoblast activation: impairment in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. J Med Genet 2005;42(3):214-20.
- **Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN.** AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu Rev Biochem. 1999;68:965-1014.
- **Cheng JQ, Altomare DA, Klein MA, Lee WC, Kruh GD, Lissy NA, Testa JR.** Transforming activity and mitosis-related expression of the

AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. Oncogene. 1997;14(23):2793-801.

- **Coffer PJ, Woodgett JR**. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. Eur J Biochem. 1991 Oct 15;201(2):475-81.
- **Columbaro M, Capanni C, Mattioli E, Novelli G, Parnaik VK, Squarzoni S, Maraldi NM, Lattanzi G**. Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. Cell Mol Life Sci 2005;62(22):2669-78.
- **Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA**. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995;378(6559):785-9.
- **D'Amico M, Hulit J, Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Bouzahzah B, Fu M, Augenlicht LH, Donehower LA, Takemaru K, Moon RT, Davis R, Lisanti MP, Shtutman M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A, Troussard AA, Dedhar S, Pestell RG**. The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. J Biol Chem 2000;275(42):32649-57.
- **Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME**. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 1997;91(2):231-41.
- **Davis RJ**. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell. 2000;103(2):193-200.
- **Del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G**. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science. 1997;278(5338):687-9.
- **Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S**. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen

synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(19):11211-6.

- **Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ**. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Dev. 1998;12(22):3499-511.
- **Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffe PJ**. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. Curr Biol. 2000;10(19):1201-4.
- **Du K, Montminy M**. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. J Biol Chem. 1998;273(49):32377-9.
- **Eguez L, Lee A, Chavez JA, Miinea CP, Kane S, Lienhard GE, McGraw TE**. Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. Cell Metab. 2005;2(4):263-72.
- **Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB**. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer Res. 2004;64(11):3892-9.
- **Embi N, Rylatt DB, Cohen P**. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. Eur J Biochem. 1980;107(2):519-27.
- **Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J**. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin. 2005;37(11):719-27.
- **Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA**. Protein kinase B/Akt at a glance. J Cell Sci. 2005;118(Pt 24):5675-8.
- **Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA**. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. J Biol Chem. 2004;279(39):41189-96.

- **Ferkey DM, Kimelman D.** GSK-3: new thoughts on an old enzyme. *Dev Biol.* 2000;225(2):471-9.
- **Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC** **PI3K:** downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* 1997;88(4):435-7
- **Frödin M, Antal TL, Dümmler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, Biondi RM.** A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 2002;21(20):5396-407
- **Gao T, Furnari F, Newton AC.** PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* 2005;18(1):13-24.
- **Gao Y, Chaudhuri J, Zhu C, Davidson L, Weaver DT, Alt FW.** A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity.* 1998;9(3):367-76.
- **Gille H, Downward J** Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem.* 1999;274(31):22033-40.
- **Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, Shumaker DK, Spann TP.** Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 2002;16(5):533-47.
- **Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS.** Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *PNAS* 2004;101(24):8963-8.
- **Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T.** Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem.* 1999;274(24):17184-92

- **Hanada M, Feng J, Hemmings BA** Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. Biochim Biophys Acta. 2004;1697(1-2):3-16.
- **Hanks SK, Hunter T** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. 1995; 9(8):576-96.
- **Hanks SK, Quinn AM** Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. Methods Enzymol. 1991;200:38-62.
- **Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K** Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell. 2002;110(2):177-89.
- **Hill MM, Andjelkovic M, Brazil DP, Ferrari S, Fabbro D, Hemmings BA**. Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. J Biol Chem. 2001;276(28):25643-6..
- **Hill MM, Hemmings BA**. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. Pharmacol Ther. 2002 ;93(2-3):243-51.
- **Hu Y, Yao J, Liu Z, Liu X, Fu H, Ye K**. Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. EMBO J. 2005;24(20):3543-54..
- **Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, Leitges M, Rawlings DJ, Kawakami T**. Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. J Biol Chem. 2004;279(46):47720-5.
- **Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV**. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. Mol Cell Biol. 2001;21(3):893-901.

- **Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM** . mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell. 2002;110(2):163-75.
- **Kim L, Kimmel AR**. GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. Curr Opin Genet Dev. 2000;10(5):508-14.
- **Koul D, Yao Y, Abbruzzese JL, Yung WK, Reddy SA**. Tumor suppressor MMAC/PTEN inhibits cytokine-induced NFkappaB activation without interfering with the IkappaB degradation pathway. J Biol Chem. 2001;276(14):11402-8.
- **Kumaran RI, Muralikrishna B, Parnaik VK**. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. J Cell Biol. 2002;159(5):783-93.
- **Kunkel MT, Ni Q, Tsien RY, Zhang J, Newton AC**. Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. J Biol Chem 2005;280(7):5581-7.
- **Leukel M, Jost E**. Two conserved serines in the nuclear localization signal flanking region are involved in the nuclear targeting of human lamin A. Eur J Cell Biol. 1995 ;68(2):133-42.
- **Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA, Hiles ID**. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. Oncogene. 1999;18(56):8024-32.
- **Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, Huang JD, Li KM, Chau PY, Chen DJ, Pei D, Pendas AM, Cadiñanos J, López-Otín C, Tse HF, Hutchison C, Chen J, Cao Y, Cheah KS, Tryggvason K, Zhou Z**. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. Nat Med 2005;11(7):780-5.

- **Majewski M, Nieborowska-Skorska M, Salomoni P, Slupianek A, Reiss K, Trotta R, Calabretta B, Skorski T.** Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. Cancer Res. 1999;59(12):2815-9.
- **Manning BD, Cantley LC.** AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell 2007;129(7):1261-74.
- **Maraldi NM, Lattanzi G, Sabatelli P, Ognibene A, Squarzone S.** Functional domains of the nucleus: implications for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 2002;12(9):815-23.
- **Maraldi NM, Lattanzi G.** Linkage of lamins to fidelity of gene transcription. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2005;15(4):277-94..
- **Martelli AM, Manzoli L, Cocco L.** Nuclear inositides: facts and perspectives. Pharmacol Ther. 2004;101:47-64.
- **Meek SE, Lane WS, Piwnica-Worms H.** Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. J Biol Chem. 2004 279: 32046-54.
- **Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelković M, Hemmings BA.** Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. J Biol Chem. 1997;272(48):30491-7
- **Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR.** PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. Semin Cell Dev Biol. 2004;15(2):161-70.
- **Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW.** Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science. 1997; 275:1787-90.
- **Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N.** Cyclin D expression is controlled post-

transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. J Biol Chem. 1998;273(45):29864-72.

- **Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR.** Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. Biochem J. 1999;344 Pt 2:427-31.
- **Nicholson KM, Anderson NG. (2002)** The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cell Signal. 14:381-95.
- **Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, Suizu F.**Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. FASEB J. 2007;21(10):2273-84.
- **Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB.**Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using shortsequence motifs. Nucleic Acids Res 2003;31(13):3635-41.
- **Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ.** Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. Nature. 1998;394(6690):295-9.
- **Ouyang Y.B., Zhang XH, He Q.P., Wang G.X., Siesjo B.K., Hu B.R.** Differential phosphorylation at Ser473 and Thr308 of Akt-1 in rat brain following hypoglycemic coma. Brain Res 2000;876:191- 195.
- **Perich JW, Meggio F, Reynolds EC, Marin O, Pinna LA.** Role of phosphorylated aminoacyl residues in generating atypical consensussequences which are recognized by casein kinase-2 but not by casein kinase-1. Biochemistry 1992;31(25):5893-7.
- **Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S.** Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical

- roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. J Biol Chem. 2001;276(29):27462-9.
- **Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE.** Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. J Biol Chem. 2000;275(15):10761-6.
 - **Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P.** Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. J Biol Chem. 1999 Jun;274(24):17179-83.
 - **Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM.** Structure, function, and biology of SHIP proteins. Genes Dev. 2000;14(5):505-20.
 - **Romashkova JA, Makarov SS.** NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. Nature 1999;401(6748):86-90.
 - **Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S.** Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. Mol Cell Biol. 2001;21:5644-57.
 - **Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH, Earnshaw WC.** Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. EMBO J. 2002;21(8):1967-77.
 - **Salinas M., Lopez-Valdaliso R., Martin D., Alvarez A., Cuadrado A.** Inhibition of Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. Mol. Cell. Neurosci 2000;15:156-169.
 - **Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE.** Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. J Biol Chem 2003;278:14599-602.

- **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM**. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science. 2005;307:1098-101.
- **Sato S, Fujita N, Tsuruo T**. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:10832-7.
- **Scheid MP, Duronio V** Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(13):7439-44
- **Schmelzle T, Hall MN**. TOR, a central controller of cell growth. Cell 2000;103(2):253-62.
- **Schürmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM** p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. Mol Cell Biol 2000;20(2):453-61.
- **Sekulić A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT**. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. Cancer Res. 2000;60:3504-13.
- **Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, Schaefer E, Walsh K, Rosenzweig A, Torella D, Nurzynska D, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Sussman MA**. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. Circ Res. 2004;94:884-91
- **Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A**. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:5522-7.

- **Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B.** Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. EMBO J. 1997;16:6151-61.
- **Song G, Ouyang G, Bao S.** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med. 2005;9(1):59-71.
- **Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW.** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell. 1998;95(1):29-39.
- **Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT.** Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. Science. 1997;277(5325):567-70.
- **Takano M, Koyama Y, Ito H, Hoshino S, Onogi H, Hagiwara M, Furukawa K, Horigome T.** Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in Xenopus egg extracts. J Biol Chem 2004;279:13265-71.
- **Takuwa N, Fukui Y, Takuwa Y.** Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. Mol Cell Biol 1999;19(2):1346-58.
- **Tang Y, Zhou H, Chen A, Pittman RN, Field J.** The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. J Biol Chem. 2000;275(13):9106-9.
- **Toker A, Newton AC.** Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. J Biol Chem. 2000;275(12):8271-4.

- **Van den Heuvel, A.P.J., de Vries-Smits, A.MM., van Weeren, P.C., Dijkers, P., de Bruyn, K.M.T., Riedl, J.A., and Burgering, B.M.T.** Binding of protein kinase B to the plakin family member periplakin. *J Cell Sci* 2002;115: 3957-3966.
- **Vanhaesebroeck B, Waterfield MD.** Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res.* 1999;253(1):239-54.
- **Vojtek AB, Taylor J, DeRuiter SL, Yu JY, Figueroa C, Kwok RP, Turner DL.** Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 2003;23(13):4417-27.
- **Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF.** The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6195-206.
- **Williams MR, Arthur JS, Balendran A, van der Kaay J, Poli V, Cohen P, Alessi DR.** The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol.* 2000;10(8):439-48.
- **Wyllie AH.** Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer.* 1993;67(2):205-8
- **Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, Hess D, Hemmings BA, Barford D.** Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell.* 2002; 9:1227-40.
- **Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A.** Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 2005;20(4):539-50.
- **Zastrow MS, Vlcek S, Wilson KL.** Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 7):979-87.

- **Zheng WH, Kar S, Quirion R** Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. J Biol Chem. 2000; 275:39152-8
- **Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC.** Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. Nat Cell Biol. 2001; 3 :245-52.