



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO NEUROBIOLOGIA
CICLO XXIII

**Ruolo della regolazione post-traduzionale del fattore di trascrizione
FoxO3 nel muscolo scheletrico durante l'atrofia muscolare**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Daniela Pietrobon

Supervisore : Dr. Marco Sandri

Dottorando : Enrico Bertaglia

ABBREVIAZIONI

BSA : *Bovine-Serum Albumin*
CBP: *CREB Binding Protein*
CK1: *Caseine Kinase 1*
DBE: *Daf-16 family member-Binding Element*
DTT: Di-tio-tritolo
DYRK1: *dual-specificity tyrosine phosphoriated and regulated kinase 1*
FBS: *Fetal Bovine Serum*
Fox: *Forkhead box*
FoxO: *forkhead box-containing, sottofamiglia O*
GFP: *Green Fluorescent Protein*
GSK3: *Glycogen Synthase Kinase 3*
HAT: *Histone Acetyl-Transferase*
HDAC: *Histone DeAcetylase*
HEK 293FT: *Human Embryonic Kidney Cell line*
IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1*
Mafbx: *Muscle atrophy f-box protein (Atrogin-1)*
MuRF-1: *Muscle Ring Finger protein*
mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*
MyHC: *myosin heavy chain*
NES: *Nuclear Export Signal*
NLS: *Nuclear Localization Sequence*
PDK1: *phosphoinositide-dependent protein kinase 1*
PI3K: *fosfatidilinositolo-3-chinasi*
PIP₂: *fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato*
PIP₃: *fosfatidilinositolo-3,4,5-trisfosfato*
PKB: *proteina chinasi B (AKT)*
PLB: *Passive Lysis Buffer*
SCF: *Skp1-Cullin1-Fbbs complex*
SDS: *Sodio Dodecil-Solfato*
SGK: *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase*
Sir2: *Silencing Information Regulator*
TSA: *Tricostatina A*

INDICE

RIASSUNTO	7
SUMMARY	11
1. INTRODUZIONE.....	13
1.1 STRUTTURA GENERALE DEL MUSCOLO SCHELETRICO.....	13
1.1.1 <i>Fibre muscolari</i>	15
1.2 IL MUSCOLO SCHELETRICO E IL SUO TROFISMO	15
1.3 LA DEGRADAZIONE PROTEICA MEDIANTE IL PROTEASOMA.....	16
1.4 LA VIA DEL SEGNALE IGF-1/PI3K/AKT E LA DETERMINAZIONE DELLA MASSA MUSCOLARE	18
1.5 LA FAMIGLIA DEI FATTORI TRASCRIZIONALI FOXO	19
1.5.1 <i>Fosforilazione: localizzazione</i>	21
1.5.2 <i>Acetilazione: attività trascrizionale</i>	23
1.5.3 <i>Ubiquitinazione: stabilità</i>	25
2. MATERIALI E METODI.....	27
2.1 LINEE CELLULARI E COLTURA	27
2.2 TRASFEZIONE IN COLTURE CELLULARI E PLASMIDI UTILIZZATI	27
2.2.1 <i>Lisi cellulare e quantificazione dell'estratto proteico</i>	29
2.3 WESTERN BLOT.....	30
2.3.1 <i>Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE)</i>	30
2.3.2 <i>Trasferimento su membrana di nitrocellulosa</i>	31
2.3.3 <i>Riconoscimento mediante Anticorpi</i>	31
2.4 IMMUNOPRECIPITAZIONE	32
2.5 MUTAGENESI.....	33
2.6 TRASFORMAZIONE BATTERICA	34
2.7 PURIFICAZIONE DI PLASMIDI.....	35
2.8 TRASFEZIONE IN VIVO	36
2.9 TAGLIO DEI MUSCOLI E IMMUNOISTOCHEMICA	37
2.10 DENERVAZIONE.....	38
2.11 TRATTAMENTO CON MG262	38
2.12 SAGGIO LUCIFERASI.....	38
2.12 ESTRAZIONE DELL'RNA	40
2.13 ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA	40
2.13.1 <i>Determinazione del livello di espressione</i>	41
2.13.2 <i>Disegno dei Primer</i>	41
2.13.3 <i>Retrotrascrizione e sintesi del cDNA</i>	41
2.13.4 <i>Reazione di Real-Time PCR</i>	42
2.14 ANALISI STATISTICHE.....	42
3. RISULTATI	45
3.1 INDAGINI SULL' ACETILAZIONE DI FOXO3 IN UN MODELLO CELLULARE	46
3.2 MUTAGENESI DELLE LISINE ACETILABILI	48
3.3 STUDI IN VIVO DELL'EFFETTO DELL' ACETILAZIONE SULL' ATTIVITÀ PROMOTORIALE	50
3.4 STUDI IN VIVO SULL' ATROFIA MUSCOLARE	52
3.5 STUDI IN VIVO SULLA LOCALIZZAZIONE DI FOXO3 DURANTE L' ATROFIA.....	55

3.6- LOCALIZZAZIONE CITOPLASMATICA E DEGRADAZIONE	57
4. DISCUSSIONE	61
5. APPENDICE	67
6. BIBLIOGRAFIA	69

RIASSUNTO

La perdita di massa muscolare è una condizione debilitante che aggrava il quadro clinico di diverse patologie sistemiche e per la quale al momento non esiste alcuna terapia efficace che ne blocchi l'insorgenza dei sintomi.

L'identificazione della famiglia dei fattori di trascrizione FoxO come responsabile dell'espressione delle ubiquitina-ligasi, Atrogin-1 e MuRF1, e della perdita di massa muscolare potrebbe far supporre di aver trovato un buon bersaglio per lo sviluppo di farmaci atti a bloccare la perdita di massa del muscolo scheletrico agendo proprio su FoxO, inibendone l'attività.

Tuttavia questa idea potrebbe portare ad alcuni problemi, infatti lo sviluppo di un inibitore di FoxO potrebbe, da una parte, frenare la perdita di proteine muscolari, ma dall'altra potrebbe favorire l'insorgenza di tumori, di malattie autoimmuni e di altre patologie. Questo dualismo è dovuto al controllo che FoxO3 ha su molti aspetti della biologia cellulare come l'apoptosi, il ciclo cellulare, la gluconeogenesi, la sensibilità all'insulina e controlla questi processi biologici in maniera sia cellulo-specifica che tessuto-specifica.

Il nostro approccio, per essere efficace, dovrebbe quindi essere basato sull'inibizione specifica dell'interazione di FoxO3 con i promotori dei geni dell'atrofia nel muscolo scheletrico. Tuttavia questo modello implica una conoscenza dettagliata della regolazione di FoxO3 all'interno del nucleo della fibra muscolare e della sua interazione con i promotori dei geni dell'atrofia. Per raggiungere questo scopo ci siamo addentrati nello studio dei meccanismi di modificazione post-traduzionale che modulano negativamente l'attività del fattore trascrizionale FoxO3: fosforilazione, acetilazione e ubiquitinazione.

Quando è accesa la via di segnale PI3K/AKT, FoxO3 è normalmente fosforilato e inattivo, venendo trattenuto nel citoplasma. Quando, durante l'atrofia, questa via è repressa, FoxO3 può traslocare nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni bersaglio (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004).

La prima parte del mio dottorato si è incentrata sullo studio di un meccanismo in grado di regolare negativamente l'attività di FoxO3 quando questo si trova all'interno del nucleo, dove è normalmente attivo: l'acetilazione.

Dati in letteratura hanno dimostrato mediante analisi di spettrometria di massa che in seguito a stress ossidativo si ha acetilazione di particolari lisine di FoxO3, condizione presente durante le atrofie (Brunet 2004, Greer and Brunet 2005).

Per capire il ruolo dell'acetilazione abbiamo deciso di mutare le lisine acetilabili in arginine, residui non acetilabili che mantengono la carica positiva permettendo il legame al DNA, o in glutamine, residui privi di carica che permettono di mimare un'acetilazione costitutiva.

Abbiamo testato l'attività trascrizionale dei vari mutanti mediante saggi di luciferasi, utilizzando come "reporter" un costrutto in cui il gene delle luciferasi è fuso ad un promotore composto da sei ripetizioni seriali della sequenza nucleotidica riconosciuta da FoxO.

I risultati ottenuti con i mutanti hanno confermato che l'acetilazione modula la capacità di FoxO3 di legarsi ad un promotore. La diminuzione dei residui acetilabili induce un aumento dell'attività trascrizionale in maniera pressoché lineare, si è infatti osservato un aumento dell'attività trascrizionale di una volta e mezza quando si mutavano tre siti ed un incremento di tre volte quando si

mutavano sei lisine. In contrapposizione i mutanti che mimavano l'acetilazione causavano una netta diminuzione delle capacità trascrizionali di FoxO3. Il dato conferma che la regione che regola il legame al DNA e l'import nucleare è sensibile a cambiamenti della carica elettrostatica causata dall'acetilazione.

Tuttavia questi dati sulle capacità trascrizionali di FoxO3 e dei mutanti di coordinare un programma complesso come quello dell'atrofia muscolare sono stati solo parzialmente confermati dagli esperimenti *in vivo*. Infatti, mentre i mutanti che mimano l'acetilazione hanno causato una riduzione dell'attività atrofizzante di FoxO, i costrutti che bloccavano l'acetilazione non hanno esacerbato l'atrofia indotta da FoxO. Una possibile spiegazione per cui il blocco dell'acetilazione non causa una maggiore perdita di proteine sta nel fatto che la cinetica di degradazione delle proteine è, probabilmente, già al massimo delle sue potenzialità. FoxO3 è capace di indurre una elevata espressione delle ubiquitina-ligasi E3 Atrogin-1 e MuRF-1, la cui attività è regolata dalla presenza di molecole quali l'ubiquitina, i substrati e l'ATP. Di conseguenza un aumento della trascrizione di questi geni potrebbe non corrispondere ad un incremento della cinetica di reazione se non aumentano anche i fattori necessari per l'attività dell'enzima E3. Viceversa, una riduzione dell'espressione delle ubiquitina-ligasi comporta una diminuzione della degradazione proteica che si manifesta con un minor grado di atrofia.

Un altro fattore che dobbiamo tener presente e che potrebbe avere un peso nell'interpretazione dei risultati è che acetilazione ed ubiquitinazione convergono, potenzialmente, sugli stessi residui di lisina. Quindi la mutazione dei residui acetilabili di lisina in forme non più acetilabili potrebbe avere influenze sul processo di ubiquitinazione. Nello specifico è possibile che la mono-ubiquitinazione partecipi in quei residui come meccanismo di controllo dell'attività di FoxO in senso positivo, ad esempio stabilizzando la proteina.

La mutazione delle lisine che potrebbero venir modificate con la mono-ubiquitinazione priverebbe questi mutanti di un controllo positivo, spiegando i risultati visti per i mutanti lisina-arginina.

Effettuando questi esperimenti ci siamo accorti che i mutanti in cui tutti e sei i siti erano mutati in glutamina, che mimavano quindi lo stato di iperacetilazione, tendevano a localizzarsi nel citoplasma delle fibre trasfettate, facendoci supporre che questa modificazione andasse ad influire anche sulla traslocazione della proteina oltre che sull'attività trascrizionale.

Inoltre abbiamo notato che la quantità di fibre trasfettate con questo mutante era notevolmente inferiore rispetto a quanto visto per gli altri mutanti. Questa osservazione ci ha fatto supporre che la localizzazione citoplasmatica di FoxO3 fosse un prerequisito per una successiva degradazione.

Effettuando esperimenti a tempi inferiori e con l'utilizzo di inibitori del proteasoma abbiamo verificato la veridicità di questa ipotesi.

Infine abbiamo analizzato se questi fenomeni si verificassero anche nella forma endogena di FoxO3, utilizzando la denervazione come modello di atrofia muscolare.

Abbiamo eseguito degli esperimenti di immunoprecipitazione per analizzare come questi eventi di modificazione si evolvessero nel tempo e quello che abbiamo potuto vedere è che l'aumento dei livelli di acetilazione e di ubiquitinazione di FoxO3 correlava con la diminuzione della quantità di proteina, spiegando in

maniera esaustiva i meccanismi che portano alla fine dell'attività di questa proteina.

In conclusione questo lavoro di tesi fornisce un quadro completo sulle modificazioni post-traduzionali che regolano il fattore di trascrizione FoxO3 durante tutto il processo di atrofia muscolare.

Questi dati forniscono una solida base per lo studio di nuovi farmaci capaci di agire in maniera mirata sulla funzione di FoxO3, limitandone i possibili effetti collaterali.

SUMMARY

Loss of muscle mass is a pathologic condition that occurs in a variety of systemic diseases, worsening patient's condition; at the moment there is no effective therapy that may block its onset or delay its occurrence.

The identification of FoxO transcription factors family members as responsables for the expression of ubiquitin-ligases Atrogin-1 and MuRF1, and of muscle mass loss, could let suppose to have found a good target for the development of drugs aimed to block the loss of skeletal muscle mass via an inhibition of FoxO.

Nevertheless this approach could lead to some problems, indeed, even if the development of an inhibitor of FoxO might, on one hand, slow down muscle protein loss, on the other hand, might promote tumorigenesis, autoimmune diseases or other pathologies.

This dualism is given by the control that FoxO3 has on several biological features, such as apoptosis, cell cycle, gluconeogenesis, insulin sensitivity and control these biological processes in both cell and tissue specific fashion.

Our approach has been based on specific inhibition of the interaction between FoxO3 and the promoter of genes involved of skeletal muscle atrophy, even if this model require a deep knowledge of the regulation of FoxO3 inside muscle cells and muscle cell nuclei.

To reach this aim we went deep into the study of post-translational modification that negatively regulate the activity of FoxO3 transcription factor: phosphorylation, acetylation and ubiquitination.

In anabolic condition the PI3K/AKT pathway is active and FoxO3 is normally phosphorylated and inactive, being kept in the cytoplasm. When, during atrophy, this pathway is repressed, FoxO3 can translocate into the nucleus where it can activate target genes transcription (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004).

At the beginning of my PhD I focused on the study of a mechanism able to negatively regulate the activity of FoxO3 while it's inside the nucleus, where it's normally active: acetylation.

In literature is reported, following mass spectrometry study, how acetylation can occur on defined lysine residues on FoxO3 sequence in response to oxidative stress, a condition present in muscle atrophy (Brunet 2004, Greer and Brunet 2005).

To elucidate the role played by acetylation we decided to mutate the acetyltable lysines into arginine, in order to prevent any acetylation, but keeping the positive charge, allowing the binding with the DNA, or in glutamines, neutral residues that mimic the acetylation effect.

We tested the constructs transcriptional activity with a luciferase assay using as a reporter a vector containing a luciferase gene under a repeated consensus sequence for FoxO.

The results we obtained confirmed that acetylation regulated FoxO3 binding on a promoter. The decrease of acetyltable residues determines an increase in transcriptional activity in a linear fashion, in fact we observed an increase of one and a half fold when three residues were mutated into arginines, raising to three fold when all six were changed.

On contrary acetylation-mimicking mutants displayed a decrease in transcriptional activity. These data confirm that the DNA binding region and nuclear localization sequence are acetylation sensitive.

Yet, these data on FoxO3 transcriptional characteristic had been just partially confirmed with *in vivo* experiments investigating FoxO3 capabilities to rule the complete program of muscle atrophy. Indeed, analyzing the atrophying ability upon over-expression, we saw that even if acetylation mimicking mutants had a minor effect, as expected, non acetylatable mutants had not a higher effect.

A possible explanation is that kinetic of degradation is, probably, already at its maximum. That's to say that FoxO3 can strongly induce Atrogin-1 and MuRF1 transcription, and being the enzymatic process of degradation limited by substrate, ATP or ubiquitin availability an higher number of enzyme doesn't lead to a faster process. Vice versa, a reduction in the level of ubiquitin ligases determines a decrease in protein degradation, which reveal a lower protein degradation rate.

Moreover, acetylation and ubiquitination might compete for the same lysine residues, so their mutation might interfere in both the processes. Specifically, there is the possibility that mono-ubiquitination affecting those residues could play a positive role on FoxO3 activity, for example stabilizing the protein.

The mutation of lysines possibly targeted with mono-ubiquitination, would deprive these mutants of its positive control, explaining the effect of lysine-arginine mutants on atrophy induction.

Performing these experiments we noticed that mutants with all six lysines mutated into glutamine, which mimicked an hyper acetylation state, used to localize in the cytoplasm of transfected fibers, letting us think that this kind of modification could interfere on localization as well as on transcriptional activity.

Moreover, we noticed that the quantity within a muscle of fibers transfected with this mutant was remarkably lower that what happened for the other constructs. this observation let us suppose that a cytoplasmic localization of FoxO3 was a prior step to its degradation.

To address this point we performed the same experiment, but in shorter time period or with a proteasome inhibitor treatment and in both cases we witnessed an increase in the number of positive fibers

Finally we analyzed these events in a endogenous form of FoxO3. In order to do this we denervated the mice, cutting the sciatic nerve, to dispose of a good model of muscle atrophy. Then we performed some immunoprecipitation experiments to analyze how these post-translational modification occurred and how they changed along the time.

What we saw is that, actually, acetylation and ubiquitination levels increased when FoxO3 protein levels decreased, explaining altogether how this protein can be negatively regulated during the process.

In conclusion this work give a complete outline of post-translational modifications regulating FoxO3 transcriptional factor during muscle atrophy.

These data taken together return solid base for a future study on drugs that may act in a accurate way on FoxO3 function, restricting any possible collateral effect.

1. INTRODUZIONE

1.1 Struttura generale del muscolo scheletrico

Il tessuto muscolare scheletrico è costituito da una serie di lunghe cellule multinucleate note come fibre muscolari o miofibre, raggruppate in fasci tenute insieme da tessuto connettivo.

Lo strato di connettivo interstiziale che circonda i fasci prende il nome di perimysio, questo si trova in continuità con un altro strato di connettivo, denominato epimysio, che costituisce una robusta lamina connettivale che va a ricoprire l'intero muscolo, continuandosi con i tendini.

Dal perimysio si dipartono delicati setti di connettivo reticolare che, occupando gli spazi presenti tra le singole fibre muscolari, le inguainano singolarmente costituendo l'endomysio.

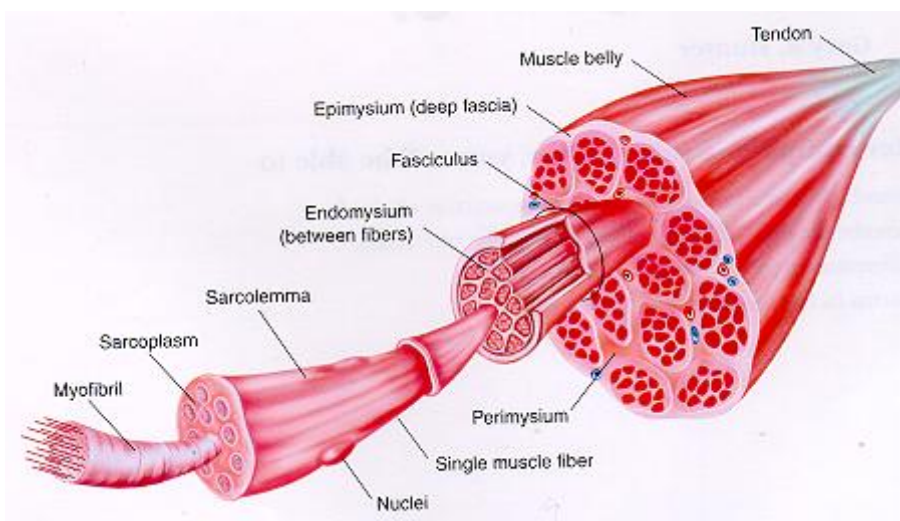


Fig.1.1: *Struttura del muscolo scheletrico, da macroscopica a microscopica.*

Adagiati sul letto di connettivo corrono una grande serie di vasi sanguigni che, seguendo in maniera parallela i setti e le loro propaggini all'interno del muscolo, si risolvono in un'intricata rete capillare ricca di anastomosi che circonda ogni fibra muscolare. Un discorso analogo si può fare per i nervi, infatti singole fibre nervose si ramificano nel muscolo andando ad innervare un gruppo di fibre muscolari, che si contraggono simultaneamente in risposta ad un'eccitazione, definendo l'unità motoria.

Mentre nella zona periferica si trovano un gran numero di nuclei per ogni miofibrilla, la parte centrale è per la maggior parte occupata da fasci cilindrici paralleli di natura proteica. Queste unità sono alla base della natura contrattile del muscolo e sono dette miofibrille.

Sezioni longitudinali delle miofibrille presentano un motivo striato e sono composte da due tipi di filamenti, distinguibili solo mediante microscopia elettronica: i filamenti spessi, costituiti da miosina, e i filamenti sottili, costituiti da actina. Ognuno dei filamenti mantiene la sua lunghezza costante a prescindere dallo stato di contrazione del muscolo.

Le miofibrille presentano una struttura a bande diversificabili per le proprietà ottiche in risposta ad illuminazione con luce polarizzata.

Le cosiddette bande A, che ruotano notevolmente il piano della luce polarizzata, si alternano a bande I, che invece vi interagiscono in maniera più blanda ruotandolo solo leggermente.

Al centro di ognuna delle bande A si trova una linea detta banda H, al cui interno è visibile la più densa linea M, costituita da una proteina, M appunto, necessaria per i collegamenti tra i filamenti di miosina contigui. Al centro delle bande I è presente la linea Z spessa circa 200 Å. Ciascun tratto di miofibrilla compreso tra due linee Z viene detto sarcomero: l'unità strutturale e funzionale che si ripete regolarmente lungo la fibrilla.

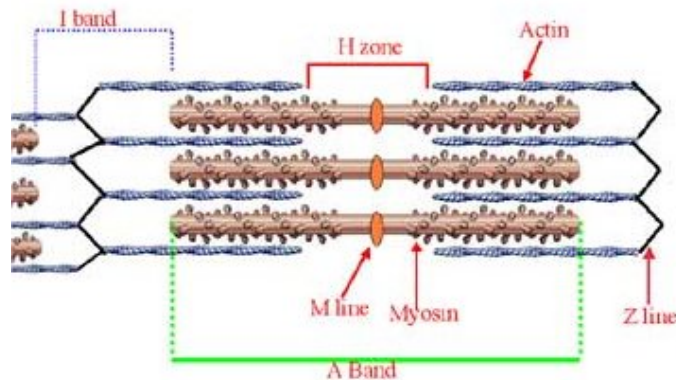


Fig. 1.2: Rappresentazione schematica del sarcomero e della sua suddivisione.

I filamenti spessi si estendono per tutta la lunghezza della banda A e sono costituiti da miosina, una proteina costituita da una parte fibrillare che si diparte dalla linea M al centro del sarcomero percorrendo tutta la banda H, per terminare con una testa globulare che prende contatto con l'actina, che compone i filamenti sottili assieme a troponina e tropomiosina. In condizioni di riposo i filamenti sottili si estendono dalla linea Z e si vanno ad interdigitare ai filamenti spessi per il tratto compreso tra banda I e linea M, mentre durante la contrazione le teste di miosina mediano lo slittamento di questa sull'actina determinando quindi un accorciamento della fibra che microscopicamente si riflette nell'accorciamento delle bande I e H, quindi dell'intero sarcomero.

Per permettere la contrazione sincrona di tutti i sarcomeri della fibra muscolare è presente un sistema di estensioni tubulari della membrana plasmatica che si estende trasversalmente nella cellula muscolare per circondare ogni miofibrilla in corrispondenza della zona di giunzione tra le bande A ed I, queste estensioni vengono definite tubuli T (o trasversali) il cui lume si trova in continuità con lo spazio extracellulare.

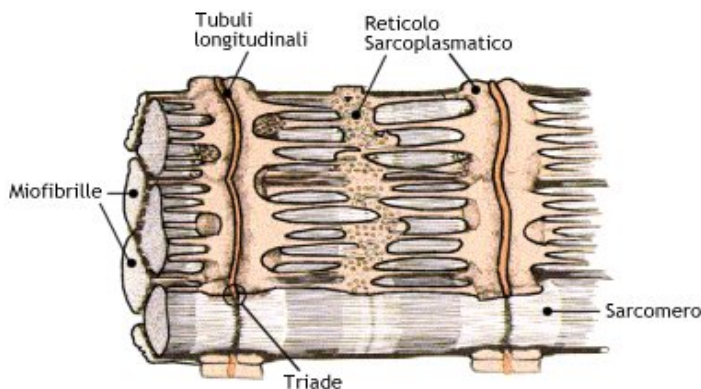


Fig. 1.3: Struttura delle membrane che circondano le miofibrille.

In stretta associazione con i tubuli T si trova un altro sistema di membrane che deriva dal reticolo endoplasmatico liscio, detto reticolo sarcoplasmatico. Questo si divide a formare un intreccio di membrane che circonda ogni miofibrilla e in

combinazione dei tubuli T si ingrossa a formare le cisterne terminali. Il complesso formato da due cisterne terminali ed un tubulo T viene definito triade.

La contrazione muscolare prende il via quando un impulso nervoso induce una depolarizzazione della membrana citoplasmatica della cellula muscolare che si trasmette tramite il sistema dei tubuli T al reticolo sarcoplasmatico, zona di accumulo intracellulare degli ioni calcio. La conseguenza della depolarizzazione è quindi il rilascio degli ioni calcio dal reticolo sarcoplasmatico al citoplasma dove inducono lo scorrimento dei filamenti comportando l'accorciamento dei sarcomeri. Il processo è ATP-dipendente e l'energia richiesta viene fornita dai numerosi mitocondri presenti negli interstizi tra le miofibrille.

1.1.1 Fibre muscolari

I muscoli scheletrici dei mammiferi sono composti prevalentemente da due tipi di fibre muscolari, con differenti proprietà fisiologiche; le fibre di tipo 1, denominate lente e le fibre di tipo 2, o veloci.

I due tipi di fibre muscolari si diversificano per: il tipo di proteine fibrillari, il reticolo sarcoplasmatico, il metabolismo energetico, la quantità di mitocondri, l'irrorazione sanguigna, la dimensione della sezione, la resistenza alla fatica e la forza sviluppata.

È importante notare come all'interno di un muscolo si trovino entrambi i tipi di fibra ed è la percentuale di queste che ne determina le proprietà generali, permettendoci quindi di dividere i muscoli in lenti e rapidi a seconda della prevalenza di uno o dell'altro tipo.

Le fibre di tipo 1 presentano una bassa velocità di contrazione e rilasciamento, ed un'elevata resistenza alla fatica. Contengono grandi quantità di mitocondri, il che ne rivela la natura metabolica di tipo ossidativo e per questo vengono anche dette aerobiche. Inoltre queste fibre presentano grandi livelli di mioglobina ed una notevole irrorazione sanguigna che contribuiscono alla tipica colorazione rossa.

Le fibre di tipo 2, veloci, si possono suddividere in tre sottotipi nei tipi: 2A, 2X e 2B, le cui proprietà variano gradualmente: le fibre 2B sono le più veloci e affaticabili, mentre le 2A sono relativamente più lente ma dotate di metabolismo più ossidativo e ricche in mitocondri, le 2X hanno proprietà intermedie.

Gli stimoli che i muscoli ricevono durante lo sviluppo e l'attività che compiono concorrono a determinarne la composizione nei diversi tipi di fibre.

1.2 Il muscolo scheletrico e il suo trofismo

Per sua struttura, dunque, il muscolo scheletrico risulta essere la principale riserva proteica dell'organismo e agisce quindi ponendosi in posizione di rilievo nel ciclo biochimico dell'azoto e determinando il rilascio di proteine durante periodi di carenza di nutrienti.

Questa semplice osservazione può far intuire un ruolo attivo di questo tessuto, che quindi si comporta in maniera plastica e reattiva alla ricezione di stimoli esterni; la condizione fisiologica di normalità risulta in un equilibrio su cui pesano due estremi contrastanti che derivano proprio dall'esasperazione di questi stimoli in due versi opposti.

L'allenamento fisico, specialmente quello anaerobico, va ad agire sul muscolo determinandone un aumento di volume che si estrinseca non con l'aumento delle cellule muscolari presenti nel tessuto, ovvero un'iperplasia, bensì con l'aumento delle dimensioni delle fibre già esistenti, un processo noto come ipertrofia. La spiegazione di tale fenomeno risiede nell'aumentata sintesi e deposizione di proteine contrattili nelle fibre che determina un aumento del diametro di queste, un effetto che esternamente appare come un ingrossamento della massa muscolare.

Al contrario, la perdita delle proteine contrattili comporta una diminuzione del diametro delle fibre, un evento noto come atrofia, risultando in una diminuzione della sua massa e della sua forza. Questa manifestazione si presenta in diverse condizioni, che possono variare ampiamente, comprendendo: l'inattività fisica, l'alterata conduzione nervosa, la carenza di nutrienti, fino ad una vasta serie di condizioni patologiche quali la cachessia neoplastica, la sepsi, il diabete, l'AIDS e l'uremia (Nader, 2005).

Questi processi, ipertrofia e atrofia, sono in parte governati tramite le stesse vie di segnale intracellulare e, al contempo, da meccanismi del tutto indipendenti.

Ne consegue che il mantenimento della massa muscolare risulta regolato da un bilanciamento tra queste vie di segnale, che determinano l'equilibrio tra sintesi proteica, che sposta il peso verso l'ipertrofia e la degradazione proteica che invece spinge verso l'atrofia. Esiste quindi una regolazione molto fine alla base di un programma definito fin nel particolare.

La degradazione proteica implicata nell'atrofia muscolare coinvolge diversi sistemi proteolitici: le calpaine, proteasi Ca^{2+} -dipendenti, la segregazione e la distruzione all'interno del compartimento lisosomiale, le caspasi, ma soprattutto la via dell'ubiquitina e proteasoma, che costituisce il principale sistema.

1.3 La degradazione proteica mediante il proteasoma

La ricerca dei geni implicati nell'exkursus delle atrofie è stata oggetto di intensi studi. Una decina di anni fa, usando la tecnica del microarray (Gomes *et al.*, 2001) per lo studio dell'espressione genica, si sono scoperti due geni che venivano indotti notevolmente in diversi tipi di atrofie, sia dovute a inattività sia come conseguenza di diverse patologie sistemiche. I due geni in questione, specificamente espressi nel muscolo, codificano per due ubiquitina ligasi e sono state chiamate MuRF-1 (*Muscle Ring Finger protein*) ed Atrogin-1/Mafbx (*Muscle atrophy f-box protein*) (Bodine *et al.*, 2001a).

Le proteine che sono destinate alla degradazione tramite la via del proteasoma sono ubiquitinate, cioè viene legata covalentemente alla proteina una catena di molecole di ubiquitina. La proteina così marcata viene riconosciuta da parte del proteasoma 26s, che ne determina una rapida degradazione in corti frammenti peptidici di 8-25 aminoacidi.

Sono tre le componenti richieste per mediare questo processo, che risulta molto ordinato: dapprima un enzima attivatore dell'ubiquitina, E1, crea mediante un meccanismo ATP-dipendente un legame ad alta energia di tipo esterico con una molecola di ubiquitina, poi l'ubiquitina viene trasferita ad una proteina *carrier* E2 (o enzima coniugante l'ubiquitina), e che media il passaggio all'ultima delle proteine ovvero il substrato (Li *et al.*, 2003).

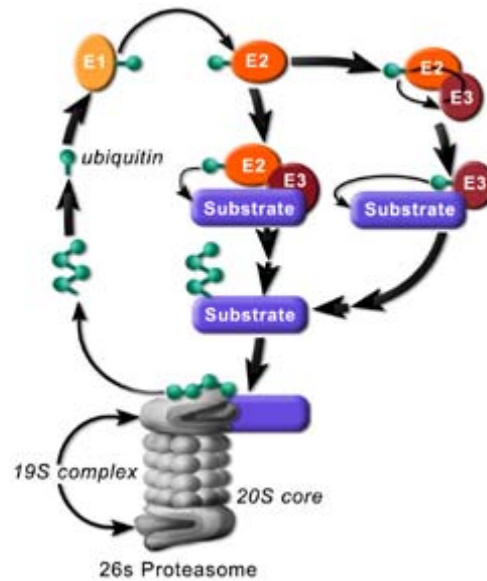


Fig. 1.4: Schema del processo di ubiquitinazione.

Le ubiquitina ligasi E3 sono gli enzimi che catalizzano l'ultimo passaggio e sono responsabili della specificità di legame al substrato. Le E3 riconoscono le

proteine a cui legare la catena di ubiquitina determinandone la successiva degradazione ed è questo passaggio la tappa limitante di tutta la reazione.

Il meccanismo definito ubiquitinazione quindi è determinato dal passaggio delle molecole di ubiquitina dal *carrier* E2 al substrato da degradare operato dalle E3.

Questo processo, mediando l'unione covalente di un solo monomero di ubiquitina per reazione, deve essere ripetuto con andamento ciclico e termina con la formazione di una catena di poli-ubiquitina che si estende dalle lisine del substrato. Quando la catene di poliubiquitina supera il numero delle quattro unità di ubiquitina diventa il segnale per venire riconosciuto dal proteasoma 26s e per la degradazione del substrato.

Il proteasoma risulta dall'unione di più complessi. Il *core* centrale, definito 20s, è costituito da quattro anelli eptamerici di cui i due esterni sono formati da subunità di tipo α che costituiscono un poro che limita l'accesso dei substrati, mentre gli anelli interni costituiscono la camera che possiede ben tre attività proteolitiche di tipo diverso: triptica, caspatica e chimotriptica, a seconda del residuo amminoacidico riconosciuto. Mediante reazione ATP-dipendente, alle estremità di questo core 20s si legano due complessi 19s costituiti da una "base" (2 subunità di dimensioni maggiori e 6 dotate di attività ATP-asi) ed un "coperchio" (di 8 subunità) e svolgono la triplice funzione di riconoscere le sole proteine poli-ubiquitinate, di farle penetrare nel 20s aprendone il poro, nonché staccare la catena di poli-ubiquitina, permettendo il riutilizzo dei monomeri di ubiquitina.

Una volta rilasciati, i frammenti peptidici di 8-25 aminoacidi, sono degradati a singoli aminoacidi dalle isopeptidasi presenti nel citoplasma (Nandi, 2006).

L'osservazione che l'espressione di due ubiquitina-ligasi, come MuRF-1 e Atrogin-1 sia fortemente indotta durante il processo di atrofia muscolare indica come questo sistema sia determinante (Gomes *et al.*, 2001).

Ulteriori conferme a carico di questa ipotesi sono date sia da esperimenti fatti in vivo che in vitro; dapprima si è studiato il ruolo di questi due geni in colture

cellulari C2C12 e si è potuto osservare come una sovraespressione di questi geni sia in grado di indurre una rapida atrofia nei miotubi.

Tuttavia il dato più eclatante è rappresentato da topi knock-out per questi geni. Topi Atrogin-1^{-/-} o MuRF-1^{-/-} risultano vitali e fertili e dimostrano una crescita normale. Sottoponendo questi animali a condizioni di atrofia (come la denervazione) si osserva una notevole resistenza alla perdita di massa muscolare essendo i muscoli protetti dall'atrofia per il 56% e 36%, rispettivamente, per Atrogin-1^{-/-} e MuRF-1^{-/-} (Bodine *et al.*, 2001).

Atrogin-1 presenta quattro domini conservati, di cui il più importante è un F-box, motivo che si riscontra tipicamente in proteine che compongono il complesso SCF ubiquitina-ligasi. Il complesso SCF funge come una sorta di adattatore per legare le proteine da ubiquitinare e tramite l'F-box si associa ad altre, come ad esempio Skp1 o Cullin1 (non a caso il complesso SCF è così chiamato in quanto acronimo di Skp1-Cullin1-Fbps, *F-box containing proteins*) (Skowyra *et al.*, 1997). Al C-terminale è presente un motivo che interagisce con proteine PDZ di classe II, note per legare specifiche sequenze di proteine bersaglio di degradazione. Sono presenti anche una sequenza di localizzazione nucleare (NLS, *Nuclear Localization Sequence*) e una sequenza di legame all'eme del citocromo C (Gomes *et al.*, 2001).

A differenza di Atrogin-1, MuRF-1 è in grado di operare l'ubiquitinazione direttamente senza la mediazione di altre proteine. Nella struttura di MuRF-1 sono presenti un dominio *ring-finger*, da cui il nome, localizzato all'N-terminale, seguono poi un B-box, dominio a dita di zinco e al C-terminale si trova un dominio ricco di leucine che forma un superavvolgimento, responsabile dell'omooligomerizzazione.

Una volta evidenziato il ruolo predominante di questo sistema di degradazione nel processo che porta alla perdita di massa muscolare, resta da capire quali siano i segnali a monte che ne modulano l'attività.

In letteratura numerosi articoli hanno evidenziato il ruolo della via di segnale IGF1/PI3K/AKT nella soppressione dell'attività proteolitica del sistema ubiquitina-proteasoma.

1.4 La via del segnale IGF-1/PI3K/AKT e la determinazione della massa muscolare

Una vasta serie di dati sperimentali ha evidenziato che IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor I*), il più caratterizzato fattore di promozione della crescita muscolare, è sufficiente a determinare un'ipertrofia nelle fibre muscolari (Bodine *et al.*, 2001).

La crescita della massa muscolare indotta da IGF-1 trova spiegazione nella via del segnale che sta a valle di IGF-1. Il legame di IGF-1 al recettore tirosin-chinasico IGF-1R, attiva la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K). PI3K fosforila il fosfolipide di membrana fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂) a fosfatidilinositolo-3,4,5-trisfosfato (PIP₃), formando sulla membrana plasmatica un sito di legame per una serina/treonina chinasi chiamata AKT (o proteina chinasi B, PKB) (Latres *et al.*, 2005; Cantley, 2002).

Di conseguenza AKT si trova in prossimità della chinasi PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1*), che la attiva. Nello stato attivato

la proteina AKT è in grado di fosforilare una vasta gamma di substrati, che agiscono più o meno direttamente sulla regolazione della sintesi proteica.

Due dei bersagli direttamente controllati dalla fosforilazione di AKT responsabili dell'induzione di ipertrofia sono mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) e GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) (Rommel *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2004; Bodine *et al.*, 2001b).

mTOR induce un aumento della sintesi proteica andando a modulare due vie di segnale: è in grado di effettuare un controllo positivo su p70S6K, attivandola, oppure di regolare negativamente PHAS-1/4EBP1 inibendone l'azione, entrambi questi meccanismi hanno come risultato finale un aumento della sintesi proteica.

AKT mediante fosforilazione blocca GSK3, prevenendo l'azione repressiva che questo ha sulle proteine bersaglio, tra cui un fattore di inizio della traduzione, eIF2B, implicato nella sintesi proteica (Rommel *et al.*, 2001).

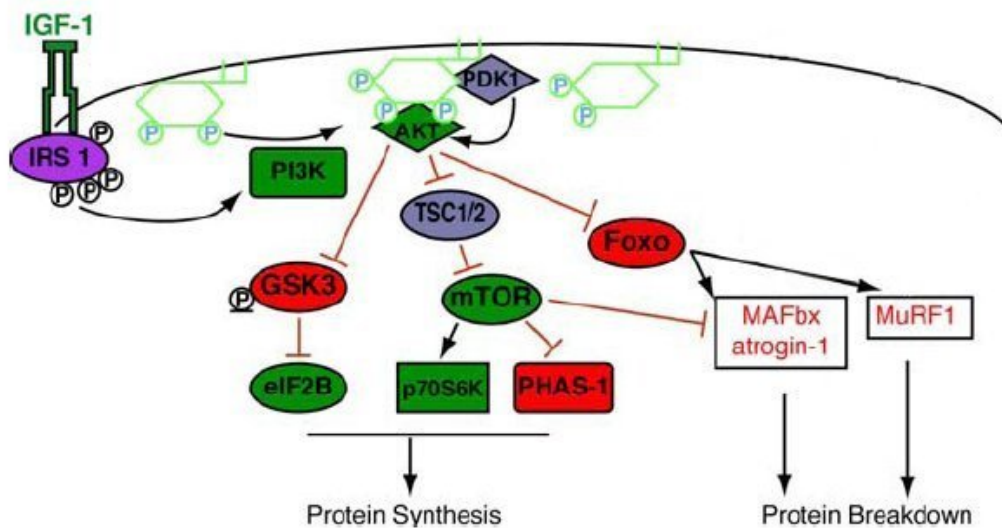


Fig. 1.5: Via di segnale di IGF-1/PI3K/Akt tra atrofia e ipertrofia (Glass, 2005).

Tuttavia AKT blocca anche la degradazione proteica inibendo le due ubiquitinasi Atrogin-1 e MuRF-1, questo meccanismo viene spiegato tramite la regolazione negativa del fattore di trascrizione FoxO (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004).

1.5 La famiglia dei fattori trascrizionali FoxO

I fattori trascrizionali FoxO appartengono ad una grande famiglia chiamata Forkhead. I membri di questa famiglia hanno conservato la regione del dominio di legame al DNA, che ha una peculiare forma ad “ali di farfalla”.

La grande famiglia Forkhead viene suddivisa in sottogruppi la cui classificazione viene fatta su base alfabetica. I membri del sottogruppo che viene regolato dalla via del segnale di AKT vengono denominati FoxO, in quanto appartengono al sottogruppo “O”.

La presenza di oltre 400 membri identificati della famiglia Forkhead, suggerisce una diversità di ruoli nella regolazione di diversi aspetti della biologia cellulare. I fattori FoxO ricoprono ruoli importanti nella risposta cellulare a segnali di

crescita, nello stress ossidativo, nei meccanismi di riparo al danno del DNA, nella regolazione di programmi che controllano il ciclo cellulare, nel metabolismo del glucosio e nel controllare la morte cellulare di tipo apoptotico (Vogt *et al.*, 2005; Biggs *et al.*, 2001; Birkenkamp and Coffey, 2003).

Nei mammiferi il gruppo FoxO comprende 4 isoforme: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX), FoxO6, che vengono espresse sia durante lo sviluppo embrionogenetico che nell'animale adulto, alcune delle quali con modalità tessuto-specifica, altre invece risultano ubiquitarie. Le proteine di questa famiglia, manifestano una notevole similarità tra loro e a livello evolutivo, dimostrando una notevole conservazione, tanto da essere presenti in *D. melanogaster* e *C. elegans* (DFOXO, Daf-16) (Biggs *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2003).

La ragione di questa conservazione è indice dell'importanza che queste proteine occupano all'interno della cellula. La regolazione della crescita cellulare e la risposta agli stress ossidativi sono solo una piccola parte del quadro generale che FoxO controlla. In *C. elegans* queste proteine, agendo sulla sopravvivenza cellulare, sono direttamente implicate nella longevità dell'intero organismo, scoperte recenti farebbero supporre un ruolo analogo anche per eucarioti più evoluti. (Greer and Brunet 2005).

La struttura di queste proteine presenta dei domini conservati, primo tra tutti, il *forkhead box*, che dà il nome alla famiglia, composto da una sequenza di 110 aminoacidi con una conformazione strutturata a due anse definite "ali" che connettono 3 domini ad α -elica, di cui il terzo si rende responsabile del legame alla doppia elica nel sito di riconoscimento [GTAAACA], noto come *Daf-16 family member-Binding Element* (DBE).

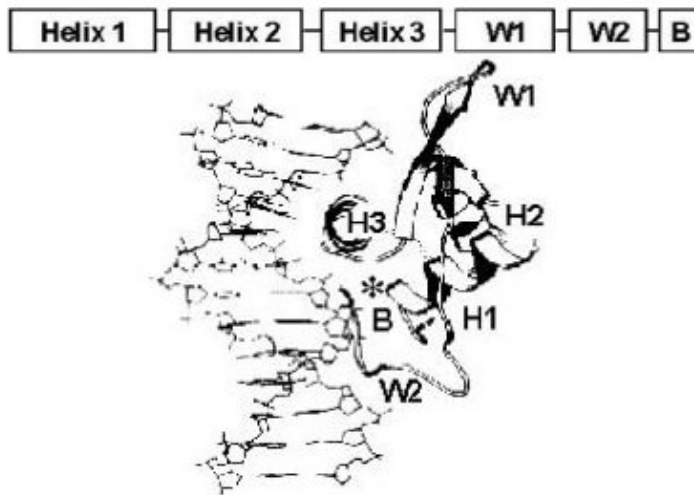


Fig. 1.6: struttura del dominio forkhead (Zhang 2002)

Al N-terminale è presente un sito di legame con le proteine chaperone 14-3-3, seguono un dominio di localizzazione nucleare (NLS) e uno di esclusione nucleare (NES) che sono implicati nello spostamento della proteina tra nucleo e citoplasma, c'è inoltre un dominio LxxLL coinvolto nel

reclutamento di recettori nucleari; il C-terminale invece comprende il dominio di trans-attivazione. (Van der Heide *et al.*, 2004).

Le regolazioni post-traduzionali delle proteine FoxO modulano l'attività trascrizionale e la localizzazione nella cellula. Nel nucleo FoxO controlla in senso attivatorio o inibitorio l'espressione di geni, mentre nel citoplasma è inattivo e va incontro a degradazione via ubiquitina-proteasoma. Ognuna delle funzioni specifiche è attivata in risposta a segnali che inducono un'appropriata modificazione post-traduzionale, conseguente a segnali extracellulari oppure allo stato energetico/nutrizionale della cellula (Vogt *et al.*, 2005).

1.5.1 Fosforilazione: localizzazione

Il principale meccanismo di regolazione cellulare di FoxO è la fosforilazione. In condizioni fisiologiche FoxO si trova nel citoplasma, mentre la sua presenza all'interno del nucleo sarebbe favorita dall'assenza di segnali di crescita.

La traslocazione dal nucleo al citoplasma è correlata alla fosforilazione del fattore che viene operata tramite l'attivazione di PI3K. Tale evento determina la fosforilazione di AKT e comporta una traslocazione di questa all'interno del nucleo dove è in grado di andare a fosforilare le proteine FoxO ivi presenti.

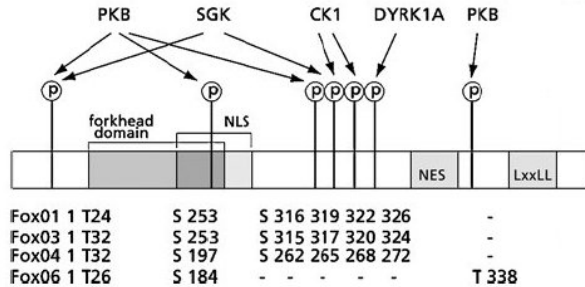


Fig. 1.7: Siti di fosforilazione su FoxO (modificata da Van Der Heide *et al.*, 2004).

L'azione di AKT si sviluppa su tre siti conservati: una treonina e due serine, una delle quali localizzata all'interno del NLS. La conseguenza di questa modificazione è il distacco del fattore dal DNA con conseguente inibizione dell'attività trascrizionale e la sua fuoriuscita dal nucleo.

Questo passaggio evidenzia come AKT sia in grado di regolare direttamente l'espressione genica andando ad agire sui fattori FoxO (Birchenkamp *et al.*, 2003). La fosforilazione indotta da AKT crea dei siti di aggancio per le chaperonine 14-3-3, con cui FoxO forma un complesso che viene traslocato nel citoplasma. Una volta nel citoplasma le due proteine restano legate per prevenire il ritorno nel nucleo, solo al variare delle condizioni, con la defosforilazione di FoxO, si avrà il distacco e le proteine potranno tornare nel nucleo (Birchenkamp *et al.*, 2003).

Si suppone quindi che queste chaperonine svolgano un ruolo attivo nel trasporto della proteina a cui si legano, tuttavia essendoci in FoxO una sequenza NES, 14-3-3 non è una mediatrice diretta dell'esportazione (Brunet *et al.*, 2002), ma sarebbe importante per impedire l'interazione di FoxO al DNA.

Oltre all'azione di AKT, FoxO è fosforilato da altre chinasi che controllano la sua localizzazione. Tuttavia, mentre è stato dimostrato che AKT è il maggior regolatore di FoxO, le altre chinasi hanno un ruolo sinergico di potenziamento dell'effetto di AKT (fig.7).

Alcune di queste chinasi comprendono SGK (*Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase*), che agisce in maniera complementare ad AKT con la quale condivide l'attivazione tramite PI3K; CK1 (*Caseine Kinase 1*) che agisce su motivi che contengono già un gruppo fosfato su una serina o treonina; DYRK1A, una chinasi presente nel nucleo che fosforila residui indipendentemente dall'attività di AKT o CK1 (Van der Heide *et al.*, 2004).

Nonostante tutto si è visto che la sola fosforilazione risulta essere necessaria, ma non sufficiente, a specificare la posizione di FoxO all'interno della cellula.

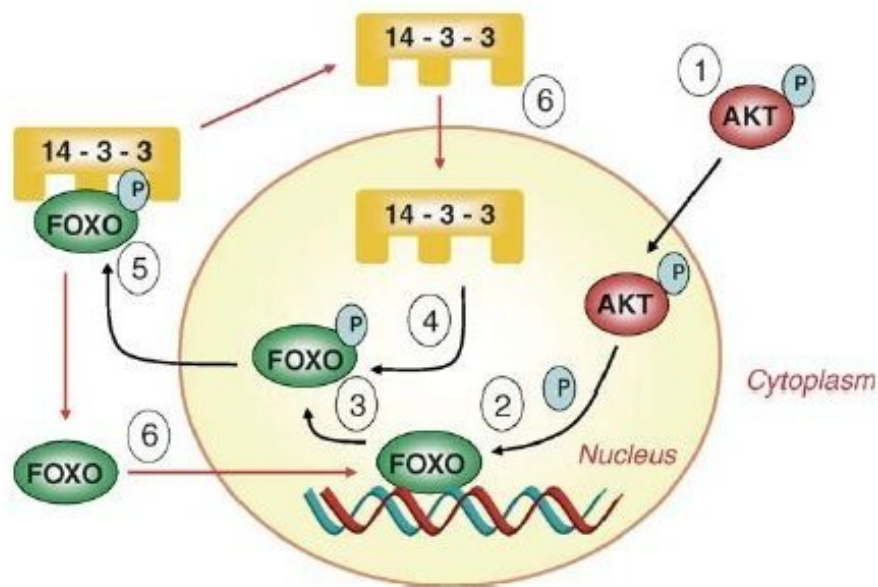


Fig. 1.8: meccanismo di regolazione di FoxO tramite Akt e chaperonine 14-3-3. (1) L'attivazione di Akt comporta l'inattivazione di FoxO (2), causandone il rilascio dal DNA (3) ed il legame alle 14-3-3 (4). Il complesso FoxO/14-3-3 viene esportato dal nucleo(5) e una volta defosforilato, le due parti sono reintrodotte nel nucleo separatamente (Nader, 2005).

Un'ulteriore osservazione è che l'aggiunta di un gruppo fosfato all'interno della NLS interferisca con l'attività di questa, debilitando l'import di FoxO nel nucleo. In questa situazione l'azione della sequenza NES, non influenzata dalla fosforilazione, diventa di primaria importanza nel facilitare la fuoriuscita di FoxO dal nucleo tramite l'interazione con CRM1 (Van der Heide *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2005).

Il meccanismo di traslocazione dal nucleo al citoplasma può essere riassunto come segue: la fosforilazione di AKT porta alla distruzione della sequenza NLS e indebolisce l'interazione col DNA; la fosforilazione di AKT sugli altri siti induce l'attivazione di altre chinasi portando alla creazione dei siti di riconoscimento per le chaperonine 14-3-3; la proteina FoxO fosforilata è riconosciuta dall'esportina CRM1 e tramite questa viene fatta uscire attraverso il poro nucleare.

Lo studio della via IGF-1/PI3K/AKT ha evidenziato il ruolo principale di questi segnali intracellulari nel regolare le atrofie muscolari tramite la trascrizione delle ubiquitina-ligasi. Una serie di esperimenti condotti sia su colture di cellule muscolari, che su animali, ha permesso di comprendere nei dettagli il ruolo di questa via.

Infatti l'attivazione di FoxO e la sua conseguente azione atrofizzante mediata da Atrogin-1 e MuRF-1 può essere impedita tramite somministrazione di IGF-1 oppure tramite la sovraespressione di una forma costitutivamente attiva di AKT (Stitt *et al.*, 2004).

Il ruolo di FoxO è stato chiarito utilizzando un mutante di FoxO3 costitutivamente attivo (c.a. FoxO3), in cui i siti di fosforilazione sono stati mutati in alanine, e di una sua forma dominante negativa (d.n.FoxO3), priva del dominio di transattivazione. Mentre c.a.FoxO era in grado di determinare un drammatico

aumento dell'atrofia sia in miotubi che in muscolo, la forma d.n.FoxO, o l'uso di siRNA specifici per FoxO, proteggevano dall'atrofia (Sandri *et al.*, 2004).

1.5.2 Acetilazione: attività trascrizionale

L'attività di FoxO può essere modulata sia mediante rilocalizzazione nel citoplasma, sia nel nucleo regolando la capacità di legare il DNA. È stato infatti recentemente studiato che, oltre alla regolazione dei fattori FoxO mediante fosforilazione, esiste un secondo livello di regolazione nucleare basata sull'acetilazione di specifici residui di lisina, che modifica le proprietà di legame della proteina al DNA.

L'aggiunta di gruppi acetile viene operata dalle acetil-trasferasi HAT (*Histone Acetyl-Transferase*), tra cui svolgono un ruolo predominante CBP (*CREB Binding Protein*) e p300; la deacetilazione invece viene compiuta dalle deacetilasi HDAC (*Histone Deacetylase*) e da SIRT1 (omologa del *Silencing Information Regulator*, Sir2, di *C. elegans*), una HDAC di classe III (Fukuoka *et al.*, 2003; Huo and Zhang, 2005).

La cromatina è costituita da subunità nucleosomali, attorno alla superficie esterna di un ottamero costituito dalle quattro proteine istoniche di base si avvolge il DNA per una lunghezza di 147 basi. La stretta interazione che sussiste tra il DNA e le proteine istoniche non rende facilmente accessibile il legame dei fattori di trascrizione e quindi la loro attività. La situazione cambia se la struttura subisce delle modificazioni che vanno a variare le interazioni tra DNA e istoni. (Edmondson *et al.*, 2002, Strahl and Allis, 2000).

Le HAT agiscono trasferendo un gruppo acetile da una molecola di Acetil-CoA ad un residuo di lisina presente all'N-terminale degli istoni; questa modificazione è in grado di indebolire l'interazione tra istone e DNA a causa dell'introduzione di una carica negativa sulla coda basica dell'istone (Sternier, 2000), facilitando l'interazione coi fattori di trascrizione.

Parallelamente però le HAT sono anche in grado di agire sui fattori di trascrizione, causando effetti diversi dipendenti dal tipo di cellula e dal fattore trascrizionale coinvolto, in alcuni casi interferisce con le capacità di legare il DNA, in altri si bloccano le interazioni con altri

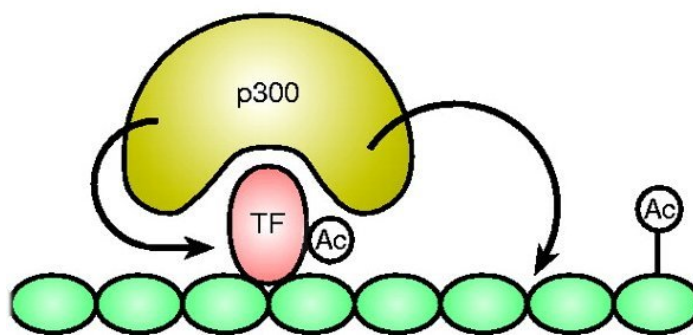


Fig. 1.9: Doppio ruolo delle HAT: acetilazione di proteine istoniche e fattori di trascrizione.

cofattori (Sternier, 2000; Van der Heide *et al.*, 2005).

Quando FoxO si trova all'interno del nucleo è in grado di interagire con CBP/p300, col quale si lega tramite il motivo LxxLL presente al C-terminale, l'interazione viene stabilizzata dal legame del dominio ricco di proline presente all'N-terminale, determinando una salda unione delle due proteine in un

complesso stabile. Questa associazione porta all'acetilazione del fattore di trascrizione (Van der Heide *et al.*, 2005).

L'interazione che CBP/p300 stabilisce con l'N-terminale di FoxO si estende per 52 aminoacidi e comprende uno dei siti di azione di AKT, l'evidenza che la fosforilazione di questo sito destabilizzi il complesso tra fattore di trascrizione e HAT ha portato all'ipotesi che le due interazioni siano mutuamente esclusive (Mahmud *et al.*, 2002).

Il ruolo dell'acetilazione dei fattori di trascrizione FoxO non è ben chiaro, nella maggior parte dei casi si è visto che il mascheramento della carica positiva della lisina con l'aggiunta del gruppo acetile determina una diminuzione dell'affinità della proteina per il DNA, che risulta in una diminuzione dell'attività trascrizionale. Tuttavia altri studi hanno invece rilevato un aumento della trascrizione in seguito all'azione di CBP/p300 (Motta *et al.*, 2004; Daitoku *et al.*, 2004). Una soluzione di compromesso viene data andando ad osservare i geni che vengono controllati da FoxO in questi processi. In particolare i geni indotti dall'acetilazione sono implicati nell'apoptosi, mentre i geni attenuati riguardano l'arresto del ciclo cellulare e la protezione dallo stress ossidativo (Brunet *et al.*, 2004). L'ipotesi più plausibile sembrerebbe comunque l'effetto repressore dell'acetilazione, come dimostrano studi condotti su FoxO1 mutato per i siti di acetilazione (Fukuoka *et al.*, 2003; Daitoku *et al.*, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2005), tuttavia questi dati sono ancora limitati per poter arrivare ad un giudizio definitivo.

La presenza di residui di lisina conservati all'interno del dominio *forkhead* farebbe supporre un ruolo dell'acetilazione strettamente correlato alla modificazione delle capacità di legame di FoxO al DNA.

È comunque da prendere in considerazione anche l'ipotesi che l'acetilazione possa essere sufficiente a causare una rilocalizzazione nel citoplasma, comportandone quindi una diminuzione dell'attività trascrizionale (Matsuzaki *et al.*, 2005; Frescas and Accili, 2005).

Una HDAC che gioca un ruolo importante nel mediare la funzione di FoxO è rappresentata da SIRT1, che media il distacco dei gruppi acetile aggiunti alle lisine da CBP/p300.

Delle tre classi di HDAC presenti, SIRT1 appartiene alla terza, che include deacetilasi coinvolte nel modulare l'espressione di importanti geni per l'invecchiamento e per il prolungamento della vita.

La classe III di HDAC si distingue dalle altre due per la sua insensibilità ad inibitori come Tricostatina A (TSA) e n-butirato, ma per venir inibita dalla nicotinamide.

Le deacetilasi di classe III sono anche note come "sirtuine" e dipendono dal NAD per la loro azione, ciò significa che non sono costitutivamente attive, ma vengono attivate quando le condizioni metaboliche della cellula determinano un aumento del NAD a discapito del NADH (Huo *et al.*, 2005).

L'HDAC riconosce la proteina acetilata ed è in grado di legarsi operandone la deacetilazione dei residui di lisina. Gli effetti della deacetilazione sono chiaramente riscontrabili in esperimenti che studiano la condizione indotta dallo stress ossidativo. In questi casi infatti i geni FoxO intervengono nel processo di protezione ed il loro effetto viene amplificato nel caso sia presente anche SIRT1. In *C.elegans* SIRT1 è capace di prolungare la vita solo in presenza di DAF-16 (Van der Horst *et al.*, 2004).

Le deacetilasi come SIRT1 agiscono de-reprimendo, e quindi attivando, le proteine FoxO. Prove a carico di questa ipotesi vengono dallo studio di cellule con copie soprannumerarie di SIRT1, in cui c'è una maggior trascrizione di geni implicati nell'arresto del ciclo cellulare, una situazione opposta viene riscontrata in campioni SIRT1^{-/-} (Vogt *et al.*, 2005).

Una visione globale del meccanismo potrebbe essere la seguente: la formazione del complesso FoxO-CBP porta all'acetilazione degli istoni e quindi una loro distensione, il che permetterebbe l'interazione del fattore di trascrizione con sequenze specifiche nei promotori di geni e porterebbe all'inizio della trascrizione; tuttavia la trascrizione così indotta verrebbe attenuata dalla stessa attività di CBP sulla proteina FoxO, effetto che potrebbe venir contrastato dalla deacetilazione operata da SIRT1, con il ripristino della piena attività del fattore di trascrizione, permettendo un'attivazione persistente (Daitoku *et al.*, 2004).

In realtà la situazione è ancora più complessa in quanto FoxO è in grado di modulare la trascrizione di geni senza legarsi al DNA. Questo avviene tramite la sua interazione, mediata dal dominio LxxLL con recettori nucleari che agiscono come fattori di trascrizione ligando-dipendenti. A seconda del recettore coinvolto FoxO può reprimere o attivare la regolazione genica, tuttavia i dati sin qui ottenuti su questo meccanismo DNA-indipendente hanno dimostrato soltanto un ruolo inibitorio (Schuur *et al.*, 2001).

1.5.3 Ubiquitinazione: stabilità

È stato osservato che AKT, oltre alla fosforilazione che opera su FoxO con conseguente traslocazione nel citoplasma, è in grado di stimolare la degradazione dei suoi substrati (Plas and Thompson, 2003). Dunque l'esclusione dal nucleo di FoxO porta all'ultimo livello di controllo della sua attività: la degradazione della proteina mediata dal sistema ubiquitina-proteasoma (§ 1.3).

Queste conclusioni sono supportate dall'osservazione che la fosforilazione, mediata da AKT, del residuo serina 256 di FoxO1 portava ad una diminuzione della quantità totale di proteina, fenomeno che non si presentava inibendo AKT o utilizzando mutanti di FoxO non fosforilabili. Esperimenti condotti con farmaci inibenti il proteasoma hanno dimostrato che c'era un recupero dei livelli di FoxO molto superiore rispetto a quando venivano bloccate le altre vie proteolitiche. Studiando tumori in cui la proteina FoxO era molto ridotta si è trovato che una ubiquitina-ligasi, Skp-2, era notevolmente indotta (Plas and Thompson, 2003; Huang *et al.*, 2005).

Skp 2 è un componente del complesso SCF ed è responsabile dell'ubiquitinazione di FoxO, limitandone l'attività (Huang *et al.*, 2005).

Sebbene sussista la stretta relazione di Skp2 con la fosforilazione mediata da AKT, altri meccanismi regolatori possibilmente implicati in questo processo sono tuttora oggetto di studio.

Infatti c'è una contraddizione tra la possibilità che FoxO venga regolato dal sistema ubiquitina-proteasoma e l'emivita della proteina. FoxO è una proteina molto stabile, con un'emivita superiore alle 10 ore. Il sistema ubiquitina-proteasoma gioca un ruolo determinante nella regolazione di proteine a corta o cortissima emivita, ma non ha molta rilevanza sulle proteine stabili.

L'apparente incongruenza che una proteina stabile come FoxO sia regolata tramite ubiquitinazione è stata recentemente chiarita. L'osservazione che la

sovraespressione di Skp2 comporta la poli-ubiquitinazione è limitato a cellule neoplastiche. In condizioni più fisiologiche non gioca un ruolo determinante la poli-ubiquitinazione bensì diventa cruciale la mono-ubiquitinazione che determina la permanenza di FoxO nel nucleo proteggendolo dall'azione inibitoria dell'acetilazione. È stato visto che l'acetilazione che segue ad uno stress ossidativo avviene con una cinetica lenta, superiore all'ora, mentre la mono-ubiquitinazione è molto più veloce e transiente, con un picco intorno ai 15 minuti. Si può quindi guardare alla mono-ubiquitinazione di FoxO come ad un meccanismo regolatore seguente a stress ossidativo, in cui l'attivazione iniziale di FoxO mediante mono-ubiquitinazione può venire terminata rapidamente da enzimi de-ubiquitinanti, cui segue l'azione delle acetilasi CBP/p300, che previene un'ulteriore mono-ubiquitinazione (Van Der Horst *et al.*, 2006).

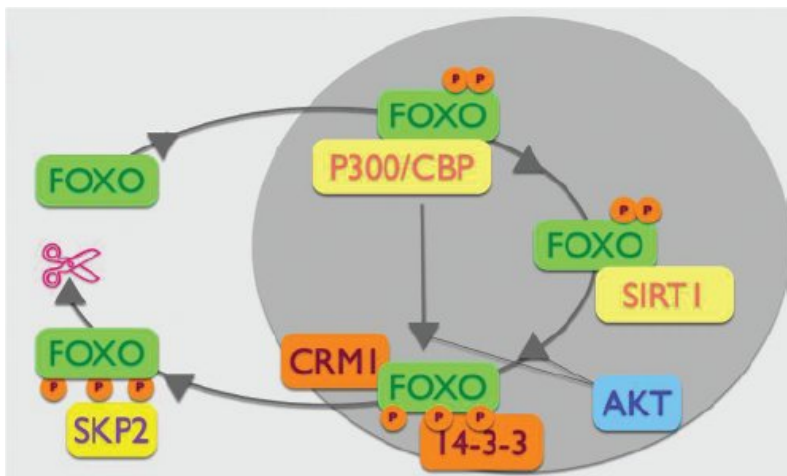


Fig.1.10: Riassunto dei processi di regolazione di FoxO (modificata da Vogt *et al.*, 2005).

Recentemente è venuta alla luce una nuova ubiquitina ligasi che potrebbe essere responsabile della degradazione di FoxO mediante il sistema ubiquitina-proteasoma. L'ubiquitina ligasi Mdm2 sarebbe infatti in grado di poliubiquitinare e determinare la seguente degradazione di FoxO, anche se in modelli cellulari non muscolari (Fu *et al.* 2009).

Questa proteina è sotto il controllo di Akt, che è in grado di fosforilarla con effetto attivatorio. Akt ha quindi una doppia azione inibitoria su FoxO3, controllo ovvero fosforilazione di FoxO3 e attivazione dell'ubiquitina ligasi per la sua degradazione.

Questo meccanismo di regolazione sarebbe importante in un'ottica in cui è necessaria l'inattivazione definitiva di FoxO, con forte riduzione della quantità presente all'interno della fibra.

In definitiva i tre livelli di regolazione di FoxO, fosforilazione acetilazione e ubiquitinazione, non sono indipendenti, bensì interagiscono tra loro per bilanciare le funzioni e l'attività del fattore di trascrizione in modo molto delicato in risposta agli stimoli esterni. In questo modo si permette che un solo evento regolatore porti a diversi effetti sulle distinte funzioni di FoxO.

2. MATERIALI E METODI

2.1 LINEE CELLULARI E COLTURA

I primi esperimenti per lo studio dell'acetilazione di FoxO3 sono stati attuati su colture cellulari. È stata utilizzata una linea cellulare immortalizzata di cellule embrionali renali di origine umana (HEK 293FT: Human Embryonic Kidney; *Invitrogen*). Queste cellule vengono coltivate in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium 4 µg/ml Glucosio, 4 mM L-glutamina, 110µg/ml piruvato; *Invitrogen*) a cui vengono aggiunti: 10% di siero fetale bovino (FBS) una soluzione di 1% di penicillina-streptomicina in fiasche da 75 cm² (Falcon); l'atmosfera di crescita viene determinata nell'incubatore (Hera Cell 150) a 37°C con una concentrazione di CO₂ del 5%.

Quando le cellule raggiungono l'80% di confluenza e vengono staccate dal fondo della fiasca mediante Tripsina - 0,25% EDTA 1mM (*Invitrogen*) e diluite per essere poi passate su altre fiasche.

2.2 TRASFEZIONE IN COLTURE CELLULARI E PLASMIDI UTILIZZATI

Le cellule HEK 293 FT vengono piastrate in piastre da 6 o 12 pozzetti in modo da avere una confluenza del 90-95% il giorno della trasfezione.

La trasfezione avviene mediante l'utilizzo di Lipofectamine[™] 2000 (*Invitrogen*), come veicolo per far penetrare il DNA all'interno dell'unità cellulare. Queste molecole sono costituite da un modulo di natura lipidica connessa ad una coda policationica. La *ratio* che sta dietro a tale formulazione è centrata sulla funzione che se ne vuole ottenere, infatti, la regione cationica si occupa di legare il DNA da veicolare all'interno della cellula bersaglio, mentre la regione lipidica si rende artefice dell'alta resa nella fusione con la membrana cellulare incrementando la percentuale di acido nucleico che verrà trasfettato.

Il primo passaggio consiste in un lavaggio delle cellule in terreno Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (*Invitrogen*) privo di siero, appositamente studiato per avere la massima efficienza di trasfezione. Di seguito si sostituisce nuovamente il terreno rimpiazzandolo con Opti-MEM[®] I addizionato con FBS al 10% e si lasciano le cellule in incubatore a 37° fino all'aggiunta dei complessi di lipidi e DNA.

Piastra di cultura	Area di Superficie per ² Pozzetto (cm)	Volume del terreno piastrato (ml)	DNA (µg) e Volume di Diluizione (µl)	Lipofectamine TM 2000 (µl) e Volume di Diluizione (µl)
6-pozzetti	10	2	4.0 µg in 250 µl	10 µl in 250 µl
12-pozzetti	4	1	1.6 µg in 100 µl	4 µl in 100 µl

Tabella 1: Rapporto tra superficie dei pozzetti e quantità di soluzioni utilizzate nella trasfezione di una piastra da sei o dodici pozzetti.

Le soluzioni di DNA e di LipofectamineTM vengono preparate separatamente in terreno Opti-MEM[®] I senza siero, dopo un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente (*room temperature*, RT), vengono mescolati e incubati per 20 minuti, nuovamente a RT. Questo periodo di incubazione serve a permettere la formazione del complesso tra acidi nucleici e LipofectamineTM.

Nei casi in cui è stata fatta una trasfezione doppia si è mantenuta una quantità totale di DNA definita dal protocollo.

Esaurito questo periodo di incubazione si procede ad aggiungere la miscela di lipofectamine con legato il DNA al terreno di coltura dei pozzetti in cui si stanno facendo crescere le cellule, permettendo l'assorbimento dei complessi. Questo passaggio si protrae per 6 ore, al termine delle quali si cambia il terreno di coltura sostituendolo con il terreno di coltura D-MEM.

A seconda dell'esperimento si sono utilizzate diverse combinazioni di plasmidi, forniti qui in elenco:

- FoxO3TM in pECE: cDNA codificante una proteina su cui sono stati mutati in arginine i 3 siti di fosforilazione bersaglio di AKT al fine di renderlo resistente alla fosforilazione operata dalla chinasi, ottenendone una forma costitutivamente attiva localizzata sempre nel nucleo. Inoltre al 5' la sequenza è fusa ad un tag HA.
- FoxO3TM (3KR) in pECE: mutante di FoxOTM in cui le lisine in posizione 242, 259 e 271 sono mutate in arginine.
- FoxO3TM (6KR) in pECE: rispetto al precedente sono mutate anche le lisine 245, 262 e 290.
- FoxO3TM (3KQ) in pECE: analogo al mutante 3KR, ma le lisine sono mutate in glutamine.
- FoxO3TM (4KQ) in pECE: rispetto al precedente ha mutata in glutamina anche la lisina 262
- FoxO3TM (6KQ) in pECE: analogo al mutante 6KR, ma le lisine sono mutate in glutamine.

- FoxO3TM K262Q in pECE: oltre alla forma TM base, ha solamente la lisina 262 mutata in glutamina.
- p300 in CMV: cDNA codificante la proteina p300 fuso ad una etichetta HA.
- pEGFP: plasmide con il cDNA per la GFP (*Green Fluorescent Protein*) a distribuzione citoplasmatica, utilizzata per vedere la percentuale di trasfezione nelle fibre muscolari.
- pRL-Null: plasmide con la sequenza codificante la luciferasi di Renilla, sotto il controllo di un promotore minimo di T7; viene utilizzato come reporter di controllo nel test luciferasi (Promega[®])
- Forkhead Sensor in pGL3 Basic: promotore sintetico costituito da 6 domini DBE, sequenze di riconoscimento di FoxO3 (GTAAACA), che controllano la sequenza di un gene per la luciferasi di lucciola.

2.2.1 Lisi cellulare e quantificazione dell'estratto proteico

Il giorno seguente a quello della trasfezione, le cellule sono lisate al fine di estrarne il contenuto proteico.

Le cellule vengono rimosse meccanicamente dal fondo del pozzetto, centrifugate (per 5 minuti a 1250 rpm) per essere poi risospese col seguente tampone di lisi:

5 mM Tris, pH 7.5
 Cocktail di inibitori di proteasi (Complete, *Roche*)
 0.5% Triton X-100
 10% Glicerolo
 1 mM DTT
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 10 μM Tricostatina A (TSA)
 10 mM Nicotinamide

Effettuata la lisi, si separano i detriti cellulari dal resto del lisato con un'altra centrifuga (10000 rpm per 10' a 4°C), conservando il surnatante per la quantificazione proteica.

L'utilizzo del saggio di Bradford ci permette di calcolare la concentrazione proteica presente nel lisato misurando direttamente il legame che si crea tra il colorante utilizzato (Coomassie Brilliant Blue, Protein Assay, *Bio-Rad*) e i residui di natura aromatica o basica, presenti nella soluzione. La misurazione viene fatta sulla base della variazione colorimetrica del mezzo, che è leggibile allo spettrofotometro (Beckman DU 530[®]) con una regolazione di lunghezza d'onda a 595 nm.

Si costruisce una retta di taratura utilizzando concentrazioni scalari di albumina di siero bovino (BSA) da 1 μg/ml a 10 μg/ml che si vanno ad aggiungere ad una soluzione acquosa al 20% di reattivo di Bradford (*Bio-Rad*).

In seguito il saggio del campione si esegue utilizzando 2 μ l del lisato nella soluzione al 20% di Bradford e andando a leggere allo spettrofotometro direttamente la concentrazione proteica che viene determinata per interpolazione della curva precedentemente disegnata.

2.3 WESTERN BLOT

Soluzioni e Tamponi:

Loading buffer:

- 1% Sodio Dodecil Solfato (SDS)
- 1 \times NuPAGE® LDS Sample Buffer
- 100 mM NuPAGE® Reducing Agent (Ditiotritolo, DTT)

Tampone di corsa 1 \times :

- 1 \times Tris Acetato

Tampone di trasferimento 1 \times :

- 1 \times NuPAGE® Transfer buffer
- 1 \times NuPAGE® Antiossidante
- 10% Metanolo

TBS 1 \times :

- 140 mM NaCl
- 2 mM KCl

TBS-T 1 \times :

- 140 mM NaCl
- 2 mM KCl
- 0,1% Tween 20

PBS 1 \times :

- 140 mM NaCl
- 2 mM KCl
- 1.5 mM KH_2PO_4
- 8 mM Na_2HPO_4

Red Ponceau:

- 5% Rosso xyledine
- 0,05% Acido Acetico

2.3.1 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE)

L'analisi delle proteine ha inizio con la loro separazione, per analizzarle in maniera qualitativa in seguito. Il primo passo consiste nel dividerle secondo il loro peso molecolare. Il lisato cellulare viene risospeso in tampone di caricamento e denaturato a 70°C, si ha così la distruzione delle strutture secondaria e terziaria

della proteina, in quanto i ponti disolfuro sono rotti dal DTT, mentre la destabilizzazione viene operata dal calore e dall' SDS, che contribuisce inoltre a conferire alle proteine una carica negativa. Le proteine, ormai ridotte a catene filamentose, sono separate secondo il loro peso molecolare con l' utilizzo di un campo elettrico uniforme. I campioni sono caricati su di un gel di poliacrilamide (NuPAGE[®], *Invitrogen*) costituito da due parti: una di impaccamento (*stacking gel*, 3%) e una di separazione (*running gel*, 8 %.). Il campo elettrico applicato è regolato ad un voltaggio di 150V. Il tempo di corsa la corsa si protrae per circa un' ora e mezza, ma può variare a seconda della compattezza del gel utilizzato e dal diverso tampone di corsa, ad ogni modo ci si regola in maniera empirica considerando il peso approssimativo della proteina cercata e si paragona ad una delle bande visibili nel *marker*.

2.3.2 Trasferimento su membrana di nitrocellulosa

L' SDS-PAGE porta ad un frazionamento della miscela proteica caricata, ora è necessario andare a cercare le proteine da esaminare. Per far questo si procede a trasferire le proteine dal gel ad una membrana di nitrocellulosa.

Il trasferimento è eseguito con l' utilizzo di un campo elettrico. Il gel contenente le proteine è posto in adesione al foglio di nitrocellulosa (*Invitrogen*) che le accoglierà, questo “*sandwich*” viene tenuto schiacciato tra un complesso costituito da fogli di carta (*Whatman*) e spugnette già imbevute del buffer di trasferimento.

Questi elementi sono quindi inseriti all' interno di una cella che fornisce un campo elettrico perpendicolare al gel permettendo di trasferire le proteine all' adiacente foglio di nitrocellulosa. La corrente applicata è predisposta ad un voltaggio di 50V, un amperaggio di 400 mA e si protrae per un' ora e mezza. Una volta finito il trasferimento si esegue una colorazione preliminare con Red Ponceau, con l' intento di verificare il corretto trasferimento delle proteine sulla membrana. Di seguito il colorante è rimosso tramite passaggi successivi in acqua deionizzata.

2.3.3 Riconoscimento mediante Anticorpi

Come prima cosa, si procede a bloccare tutti i siti di legame idrofobico presenti sulla membrana incubandola in una soluzione di tampone salino (PBS, TBS o TBS-T) con una concentrazione di latte in polvere o BSA variabile tra l' 1 e il 5% peso/volume a seconda dell' anticorpo usato. Dopo alcuni passaggi di lavaggio con una soluzione meno concentrata di saturante si procede ad incubare la membrana con una soluzione contenente un anticorpo diretto contro la proteina da riconoscere (o un epitopo fuso ad essa) e si lascia tutta la notte ad una temperatura di 4°C.

L' eccesso di anticorpo non legato viene rimosso con una serie di lavaggi eseguiti come in precedenza, successivamente si procede ad incubare la membrana con una soluzione contenente un anticorpo secondario coniugato a perossidasi di rafano (Horse Radish Peroxidase, HRP, *Sigma*), diretto contro il primario per 1 ora a temperatura ambiente. In seguito si rimuove l' anticorpo che non ha reagito con una serie di lavaggi. La rilevazione dell' immunocomplesso avviene incubando la nitrocellulosa con una soluzione contenente il substrato per l' enzima coniugato all' anticorpo secondario, il luminolo (SuperSignal[®] West Pico

Chemiluminescent Substrate, *Pierce*). Si procede quindi alla visualizzazione del risultato impressionando una lastra autoradiografica (BioMax film, *Kodak*).

2.4 IMMUNOPRECIPITAZIONE

Dal lisato proteico ottenuto dalla coltura cellulare trasfettata è possibile andare a selezionare un target proteico specifico che si vuole studiare approfonditamente, tale processo è possibile grazie ad una precipitazione specifica della proteina di interesse mediante il legame di un anticorpo diretto contro di essa.

Un primo passaggio di *pre-clearing* prevede un'ora in agitazione del composto a cui si aggiungono 20 µl di sfere di agarosio coniugate alla proteina A e G (Santa Cruz) per rimuovere il legame aspecifico di proteine. Il lisato viene incubato con un anticorpo specifico per la proteina d'interesse, per tutta la notte a 4°C in agitazione, la quantità di anticorpo utilizzata è di 4 µg per 500 µg di proteine totali. Il giorno seguente quindi si aggiungono 30 µl di Proteina A/G + coniugata a sfere di agarosio per un'ora a 4°C, sempre in agitazione. Si viene ad instaurare un legame tra la porzione Fc delle immunoglobuline specifiche dell'anticorpo e la proteina A/G presente sulle sfere di agarosio permettendo la precipitazione del complesso formato. Si effettua dunque una centrifuga di 2500 rpm per tre minuti e si trattiene il pellet che subisce una serie di tre lavaggi seriali (5000 rpm per 5 minuti a 4°C, centrifuga Eppendorf 5415 R) in una soluzione di PBS 1× con opportuni inibitori. Il campione lavato viene ricentrifugato, viene risospeso nel *loading buffer* (§ 2.3), ed infine viene denaturato per 10 minuti a 70 °C in agitazione a 1200 rpm.

Processo analogo si esegue dal muscolo, in questo caso tuttavia, analizzando solo livelli endogeni di proteine poco abbondanti, è richiesto un grosso quantitativo proteico di partenza. Vengono utilizzati tre muscoli gastrocnemi di tre diversi animali per ogni campione. I muscoli congelati vengono polverizzati tramite un mortaio ed un pestello e la polvere così ottenuta viene lisata in 1200 µl del tampone di lisi. La sospensione così ottenuta è prima mescolata con l'utilizzo di un vortex (5 secondi, velocità massima) e poi ulteriormente sminuzzata con l'ausilio di un Polytron (*Kinematica*) usando tre impulsi da 5 secondi intervallati da un minuto in ghiaccio. Il lisato viene incubato in agitazione a +4°C per 10 minuti e poi centrifugato 10 minuti a 5000g +4°C. il surnatante così ottenuto viene quantificato col metodo di Bradford e immunoprecipitati come visto per i lisati cellulari. Utilizzando però 2mg di proteine iniziali, con una concentrazione di anticorpo tra 1:100 e 1:1000 a seconda dell'anticorpo utilizzato.

Anticorpi usati :

- anti-HA policlonale: (*Santa Cruz*) policlonale preparato in coniglio che riconosce le proteine contenenti un epitopo di Emoagglutinina, come quello presente in FoxO3.
- Anti-FoxO3: (*Cell Signaling*) policlonale preparato in coniglio in grado di riconoscere il fattore di trascrizione.

- Anti-acetil-lisina: (*Cell Signaling*) preparato in coniglio, è diretto contro le lisine acetilate.
- Anti-Ubiquitina (*Biomol*) monoclinale preparato in topo, diretto contro le ubiquitine legate a substrato, monomeri e polimeri

2.5 MUTAGENESI

Il gene per FoxO3 è stato mutato con il kit di mutagenesi *QuikChange Multi Site-Directed (Stratagene)*, che permette l'inserimento di più mutazioni, fino a cinque, in un'unica reazione. Il processo si basa su un'amplificazione di tipo PCR di un *template* contenente il gene da mutare, l'unica differenza consiste nell'utilizzo di *primer* per l'amplificazione recanti delle modificazioni nella sequenza. Il disegno dei *primer* viene fatto secondo alcuni principi fondamentali che determinano la riuscita della reazione in modo ottimale: innanzitutto i *primer* contenenti le mutazioni sono fatti in modo da legarsi allo stesso filamento del plasmide che fa da *template*, quindi sono tutti "forward". I *primer* sono disegnati in un intervallo compreso tra le 25 e 30 paia di basi, mantenendo una temperatura simile tra i diversi *primer* da usare in una stessa reazione, circa di 79-80°C.

Sequenze degli oligonucleotidi:

- Arg 242: CTGATGGGGGGAGGAGCGGAAAAGC
- Arg 245: GGAGGAGCGGAAGAGCCCCCGGCG
- Arg 259: GGACAATAGCAACAGATATACCAAGAGCCG
- Arg 262: AACAGATATACCAGGAGCCGTGGCCGC
- Arg 271: GCGAGCCAAGAAGAGAGCAGCCCTGC
- Arg 290: CCCAGCTCTCCAGGTGGCCTGGCAG

- Gln 242: CTGATGGGGGGCAGAGCGGAAAAGC
- Gln 245: GGAGGAGCGGACAAGCCCCCGGCG
- Gln 259: GGACAATAGCAACCAGTATACCAAGAGCCG
- Gln 262: AACAGATATACCCAGAGCCGTGGCCGC
- Gln 271: GCGAGCCAAGAAGCAAGCAGCCCTGC
- Gln 290: CCCAGCTCTCCAGTGGCCTGGCAG

La temperatura di *melting* dei singoli *primer* è stata misurata con la formula:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

Dove N è la lunghezza del primer in basi e i valori percentuali sono espressi come numeri interi.

La massimizzazione dell'appaiamento è ottenuta disegnando il *primer* in modo che la mutazione sia posta al suo centro, di circa 10-12 basi per ogni lato, che assicurano l'appaiamento fedele della sequenza al *template*. Inoltre ogni sequenza termina con una o più G/C, per rafforzare l'attacco. Infine si è mantenuta una percentuale di GC di almeno 40%.

Nonostante un codone degenerato, sul *template* si ha un appaiamento fedele dei *primer*, che, al momento della replicazione, verranno allungati fino alla costituzione dell'intero plasmide. La continuità tra un frammento PCR e l'altro viene indotta da una ligasi termostabile presente nel mix di reazione.

Si ottengono quindi una serie di costrutti in cui una parte è a filamento singolo, contenente la mutazione, un'altra parte è data da plasmidi a due filamenti di cui solo uno contiene la mutazione, infine sono presenti i *template* senza mutazioni.

Dalla PCR si ottengono quindi dei plasmidi che portano il gene con la sequenza mutata secondo quanto pianificato. Per eliminare i plasmidi che sono composti da uno o due filamenti non mutati si esegue un taglio con l'enzima di restrizione DpnI (10 U/ μ l) che riconosce e taglia solo le sequenze mutilate ed emimetilate. L'aggiunta dei gruppi metile ad un filamento viene fatta in seguito alla duplicazione da enzimi presenti nella cellula, situazione che non si verifica durante la PCR di mutagenesi, di conseguenza verranno tagliati solo i filamenti usati come *template*. Il taglio con DpnI procede per un'ora a 37°C e restituisce una soluzione contenente solo plasmidi mutanti, che verrà usato per la trasformazione batterica. I batteri trasformati con i plasmidi a filamento singolo provvederanno a duplicarlo usandolo come stampo, restituendo un plasmide a doppio filamento contenente le mutazioni volute.

2.6 TRASFORMAZIONE BATTERICA

Terreni usati:

SOC: 2% *Bacto-Tryptone*

0.5% *Yeast Extract*

0.05% NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

20 mM glucosio

Luria Bertani (LB): 1% *Bacto-tryptone*

0,5% *Bacto-yeast*

1% NaCl

LB-Agar: 1% *Bacto-tryptone*

0,5% *Bacto-yeast*

1% NaCl

1% Agar

I batteri competenti, ceppo XL-10 gold (*Stratagene*), vengono scongelati in ghiaccio e lasciati in ghiaccio per ulteriori 10 minuti con l'aggiunta di 2 μ l di mix di β -mercaptoetanolo (specifico per XL-10 gold; *Stratagene*), per facilitare l'ingresso dei plasmidi. Un'aliquota del DNA da inserire, variabile da 1,5 a 5 μ l, viene aggiunto ai batteri e si incubano in ghiaccio per 30 minuti, successivamente si causa uno shock termico a 42°C per 30 secondi, seguito da altri 2 minuti in ghiaccio.

Si fanno quindi crescere i batteri in terreno SOC per un'ora a 37°C a 220 rpm di agitazione e poi si seminano su piastre di LB-agar con l'antibiotico di selezione del plasmide (ampicillina 100 µg/ml).

2.7 PURIFICAZIONE DI PLASMIDI

Kit Maxi-prep Qiagen®

Si inocula una piccola quota di batteri da stock congelato a -80°C o da colonia su piastra di agar in terreno Circle-Grow® contenente l'antibiotico appropriato alla selezione (kanamicina 40 µg/ml o ampicillina 100 µg/ml). La crescita avviene a 37 °C in agitatore a 225 rpm in beute da 1L per tutta la notte.

I batteri vengono precipitati in bottiglie da 250 ml (*Nalgene*) con una centrifuga (*Beckman Avanti*TM J-25) di 15 minuti in rotore JA14 (*Beckman*) a 6000 rpm, 4°C. Il surnatante viene eliminato per inversione dei tubi; il pellet invece è risospeso con una pipetta in 10 ml di tampone P1® contenente RNasi A.

Si aggiungono 10 ml di soluzione di lisi P2®, e si mescola per inversione, la lisi è portata avanti per 5 minuti a RT.

In seguito all'incubazione si aggiungono 10 ml di tampone neutralizzante P3®, e si mescola nuovamente, per poi incubare 20 minuti in ghiaccio.

Con una centrifuga da 30 minuti a 25000g e 4°C si dividono gli scarti batterici dal surnatante contenente il DNA. Facendo colare 4 ml di tampone QBT® per flusso di gravità si equilibra la colonna Qiagen-tip 500, che contiene una resina per cromatografia a scambio anionico. Si è fatto dunque filtrare il supernatante nella colonna per permettere al DNA di legarsi alla resina, proseguendo con due lavaggi con 30 ml di tampone QC® per eliminare contaminanti dalla colonnina. Tutto il percolato fin qui ottenuto viene eliminato. L'eluizione del DNA dalla colonnina viene ottenuta tramite un lavaggio con 15 ml di tampone QF®, che agisce staccando gli acidi nucleici mediante la sua elevata forza ionica, l'eluato è raccolto in tubi di polipropilene (*Nalgene*). Il plasmide viene fatto precipitare aggiungendo al DNA eluito 10.5 ml (0.7 volumi) di isopropanolo a RT. In rapida successione si mescola e si centrifuga a 25000 g in rotore JA25.5, per 30 minuti a 4 °C. Rimosso il surnatante si risospende il DNA in 5ml di etanolo al 70% a RT per rimuovere i sali precipitati e l'isopropanolo. Si ripete una centrifuga di 10 minuti come la precedente. Infine si lascia asciugare sotto cappa sterile il pellet di DNA per 5-10 minuti.

La sospensione finale del DNA è in 250 µl di tampone H₂O sterile.

Determinazione della concentrazione del DNA

Allo spettrofotometro (*Beckman DU 530*®) si misura l'assorbanza della soluzione contenente DNA alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm. La lettura a 260 nm permette il calcolo della concentrazione di acidi nucleici nel campione. A 280 nm invece si legge il picco di assorbimento delle proteine. Una densità ottica (O.D.) letta a 260 nm uguale a 1 corrisponde a 50 µg/ml di DNA a doppia elica. Il valore

del rapporto tra le letture a 260 nm e 280 nm permette di valutare la purezza del campione: preparazioni pure di DNA producono valori di $O.D._{260} / O.D._{280}$ compresi tra 1.6 e 2.

Le letture sono fatte ad una diluizione del campione di 1:200.

Kit Mini-prep Invitrogen®

Raccolta una colonia singola da una piastra selettiva, la si è messa a crescere in 5 ml di terreno LB (§ 2.9) contenente l'antibiotico appropriato alla selezione (kanamicina 40 µg/ml o ampicillina 100 µg/ml). Si è incubato per 8 ore a 37 °C in agitatore a 225 rpm.

Con una centrifuga di 5 minuti a 12000 g (Eppendorf 5415 R) si separano i batteri dal terreno, che viene rimosso per aspirazione. Il pellet batterico viene risospeso con 250 µl di tampone di risospensione R3 (contenente RNAsi A 100 µg/µl), a cui si aggiungono poi 250 µl di tampone di lisi L7 e dopo aver mescolato si incuba per 5 minuti a RT.

Al termine dell'incubazione si aggiungono 350 µl di tampone di precipitazione N4 che viene mescolato per inversione. Il lisato viene separato dagli scarti cellulari con una centrifuga da 12000 g di un minuto, di seguito lo stesso viene caricato nelle colonne con la resina anionica e con un centrifuga come la precedente si permette il legame del DNA alla resina, scartando l'eluato.

La colonna viene pulita con l'aggiunta di 700 µl di tampone di lavaggio W9, contenente un'alta percentuale di etanolo. Il tampone è quindi eliminato con una centrifuga di un minuto a 12000g.

Infine si pone la colonnina all'interno di una provetta da 1,5 ml e si aggiungono alla resina 50 µl di H₂O, il solvente di eluizione finale per il DNA purificato, l'eluizione avviene per distacco e risospensione del DNA dalla resina all'acqua, mediante una centrifuga come le precedenti.

La quantificazione del DNA viene eseguita come nel protocollo precedente, ma si usa una diluizione 1:10.

2.8 TRASFUZIONE IN VIVO

Questa metodica permette di veicolare DNA esogeno nel tessuto muscolare. Consiste nell'applicare un campo elettrico che causa la formazione di pori transienti nella membrana cellulare permettendo quindi l'ingresso del DNA plasmidico. Nello specifico la trasfezione è stata eseguita sul muscolo tibiale anteriore dei ceppi di topo CD1 di circa 2 mesi d'età.

La soluzione di iniezione contiene il DNA plasmidico (25 µg) risospeso in acqua, a cui si aggiunge una soluzione salina di NaCl la cui concentrazione finale è dello 0.9 %, in un volume finale di 40 µl per ogni muscolo da trasfettare.

La preparazione dell'animale all'operazione prevede la sua anestesia con una soluzione formata da 10 mg/kg di Zoletil (Tiletamina Cloridrato: Zolazepam Cloridrato, in rapporto 1:1) e 2 mg/kg Xilazina (Xilor), dopodiché si espone la zona da operare mediante depilazione della zampa.

Il Tibiale Anteriore viene isolato dai tessuti circostanti con procedura chirurgica per prepararlo all'iniezione della soluzione con il plasmide. Un primo elettrodo, il positivo, viene posto al di sotto del muscolo, tenendolo sollevato dall'osso, si procede quindi all'iniezione mediante microsiringa (*Hamilton*), infine si posiziona l'elettrodo negativo ortogonalmente al positivo, al di sopra del muscolo, a ricoprirlo, e si fornisce una scarica elettrica con i seguenti parametri: 5 impulsi da 20 ms, uno ogni 200 ms con un potenziale di 21 V (elettroporatore "Electro Square Portar"). La ferita viene quindi ricucita con punti di sutura con filo 6.0 e si lascia il topo al di sotto di una lampadina termica per mantenere la temperatura corporea stabile fino al suo risveglio.

2.9 TAGLIO DEI MUSCOLI E IMMUNOISTOCHEMICA

Dodici giorni dopo l'esecuzione della trasfezione in vivo si prelevano i muscoli dal topo e si congelano dapprima con un passaggio in isopentano raffreddato in azoto liquido, onde non avere un congelamento troppo veloce che rovinerebbe le fibre, e poi nell'azoto stesso, dove verranno conservati fino al momento del taglio. Il taglio del muscolo (Criostato Leica CM 1850) comincia con sezioni di 20 μm visionate al microscopio allo scopo di trovare una zona con un buon livello di trasfezione; questo è possibile in quanto viene trasfettata con FoxO3 una proteina reporter fluorescente, nel nostro caso una GFP citoplasmatica, che è facilmente visibile al microscopio a fluorescenza. Considerando quindi che la trasfezione della proteina da analizzare sia parallelamente distribuita rispetto alla GFP, una volta identificata una zona contenente una buona quantità di fibre GFP-positive si procede alla raccolta delle sezioni su vetrino. Si eseguono dei tagli seriali di uno spessore di 6 μm e si distribuiscono su vetrino secondo l'ordine di taglio in modo da avere una sequenza di sezioni del muscolo che rappresentano il muscolo in più punti. La procedura di fissazione del tessuto avviene mediante una incubazione di 10' a RT in una soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS. Gli eccessi del fissante vengono poi rimossi con tre lavaggi seriali in soluzione PBS 1 \times ognuno della durata di 5' ed eseguiti a RT. Potendo FoxO localizzarsi nel nucleo, si è dovuto procedere con la permeabilizzazione delle fibre, questo passaggio è stato eseguito con l'incubazione dei tessuti in una soluzione allo 0,1% di Triton X-100 in PBS per 2 minuti a RT. Come in precedenza viene effettuato un lavaggio in PBS 1 \times per 5 minuti a RT allo scopo di rimuovere gli eccessi di agente permeabilizzante. Prima di procedere con l'immunoreazione, si esegue un passaggio di saturazione con una soluzione di Siero Murino 10% in PBS-BSA 0,5% per bloccare i siti aspecifici di legame dell'anticorpo e si incuba per 20 minuti a RT quindi si lava con PBS 1 \times che rimuove la soluzione non utilizzata. L'immunoreazione è stata condotta in due passaggi, utilizzando un anticorpo primario non coniugato a fluorofori ed uno secondario contenente invece un fluoroforo di marcatura, nel caso specifico si è scelto un fluoroforo rosso, il Cy3, avendo già una proteina fluorescente verde nella trasfezione.

L'anticorpo primario, anti-FoxO3, (*Cell Signaling*) viene incubato a 4°C per tutta la notte ad una diluizione di 1:200 in una soluzione contenente 2% di siero murino in PBS-BSA 0,5%. Il giorno seguente si lavano via gli eccessi di anticorpo primario non legato eseguendo tre lavaggi seriali in PBS 1 \times a RT per 5 minuti in agitazione, successivamente si incuba con l'anticorpo secondario (anti-rabbit IgG

coniugato Cy3 1:150, *BioRad*), in una soluzione identica a quella del primario, per un'ora a RT. Come nel caso del primario si lava via l'anticorpo non con dei lavaggi in PBS 1×.

Da questo momento in poi si lavora al buio per evitare il decadimento della fluorescenza. Si esegue come ultimo processo una colorazione nucleare con soluzione 2 µM DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo; *Molecular Probes*) per 2 minuti a RT. Gli ultimi due lavaggi sono molto rapidi e sono prima in PBS 1× e poi in H₂O per rimuovere anche i sali del PBS che potrebbero interferire con la visione del vetrino. Per permettere l'osservazione al microscopio senza aberrazioni ottiche si monta un vetrino coprioggetto usando come mezzo di montaggio l'Elvanol (15% Poli-vinil-alcol, 30% glicerina) che svolge il doppio ruolo di far aderire il vetrino coprioggetto e di conservare la fluorescenza. Se ne aggiunge una goccia in modo da coprire le sezioni di tessuto e si adagia sopra il vetrino coprioggetto facendo attenzione che non rimangano bolle d'aria che inficerebbero la visione. La conservazione avviene a 4°C in attesa della visione al microscopio.

2.10 DENERVAZIONE

La denervazione viene eseguita mediante il taglio unilaterale del nervo sciatico. Gli animali sono anestetizzati come per la trasfezione del tibiale (§ 2.8). viene effettuata una piccola incisione nella parte posteriore alta della zampa, in vicinanza della giunzione col bacino, da questo taglio viene esposto e sollevato il nervo sciatico da cui viene reciso un segmento di circa un centimetro, onde evitare la reinnervazione, ottenendo una denervazione permanente. Si procede quindi con la saturazione della parte prossimale del nervo e della pelle.

Il muscolo controlaterale viene usato come controllo. I muscoli vengono prelevati a diversi tempi dall'operazione, rispettivamente tre, dieci e quattordici giorni e congelati direttamente in azoto per studi di immunoprecipitazione e western blot (§ 2.3, 2.4)

2.11 TRATTAMENTO CON MG262

Per studi di degradazione è stato utilizzato come inibitore del proteasoma l'MG 262 (*Boston Biochem*) solubilizzando la polvere in DMSO ad una concentrazione finale di 2mg/ml.

La somministrazione avviene via intraperitoneale ad una concentrazione di 2.45 mg/Kg in dose unica.

2.12 SAGGIO LUCIFERASI

Il sistema utilizzato per eseguire questo esperimento, il *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (*Promega*), è basato sull'utilizzo di due reporter che permettono una misura incrociata dei valori restituendo un'interpretazione affidabile e limitando le interferenze esterne.

Il risultato si basa quindi sulla misura degli effetti di due reporter enzimatici in un unico sistema, ma in tempi diversi, infatti sono misurate le fluorescenze di due tipi di luciferasi derivanti da due organismi diversi: lucciola (*Photinus pyralis*) e renilla (*Renilla reniformis*), un celenterato marino.

La diversa origine evolutiva di questi due enzimi si riflette nella loro struttura e anche nella reazione che catalizzano, di conseguenza è possibile discriminare le loro fluorescenze.

La prima parte dell'esperimento consiste nel trasfettare i costrutti di interesse nel muscolo del topo (§ 2.3). I costrutti trasfettati comprenderanno quindi: un plasmide contenente la sequenza per l'espressione della luciferasi di renilla (pRL-null, *Promega*); il costrutto che codifica per la proteina fluorescente di lucciola, posto sotto il controllo di una sequenza promotoriale riconosciuta da FoxO, un forkhead binding domain (*Forkhead Sensor*). In aggiunta vengono inserite le proteine da testare o i loro controlli negativi, ovvero: FoxO3 TM, FoxO3TM (3KR), FoxO3TM (6KR); FoxO3TM (3KQ); FoxO3TM (6KQ), pcDNA3.

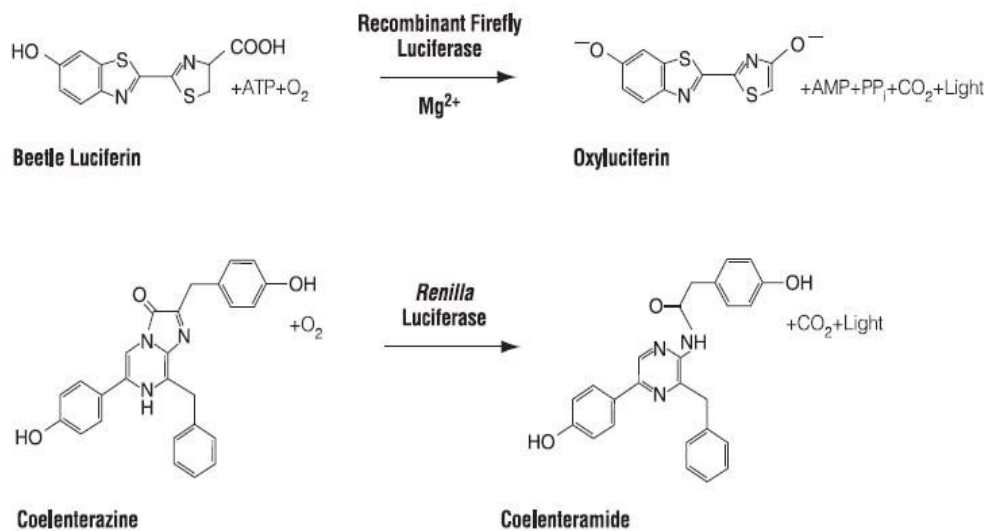


Fig. 2.1: Reazioni bio-luminescenti catalizzate dalla luciferasi di renilla e lucciola

Otto giorni dopo la trasfezione i muscoli verranno prelevati e congelati direttamente in azoto liquido in attesa della loro analisi.

I muscoli vengono pesati singolarmente con una bilancia di precisione e si prepara una quantità di soluzione di lisi (*Passive Lysis Buffer*, PLB, *Promega*) diluendolo in H₂O ad una concentrazione finale 1× in modo da ottenerne un volume finale pari a 2,5 µl per mg di muscolo, l'esatto rapporto per avere una lisi efficace.

Il processo di lisi viene iniziato polverizzando il muscolo congelato con l'utilizzo di un mortaio ed un pestello, una volta raggiunto questo stato si aggiunge il tampone di lisi PLB e si mescola con un vortex, si congela in azoto liquido ed infine si lascia scongelare lentamente a 4°C per un'ora, una volta che il lisato è scongelato si mescola con il vortex e si ripete il ciclo di congelamento in azoto e scongelamento.

Alla fine si centrifuga (12000 rpm per 30 minuti a 4°C) per separare il lisato cellulare dai frammenti che vengono scartati, ottenendo il campione da esaminare al luminometro.

Le misure al luminometro conteggiano gli elettroni emessi dalle due reazioni delle luciferasi in tempi diversi nello stesso campione.

La luminescenza emessa da entrambe le luciferasi generano segnali che decrescono nel tempo, è però possibile arrestare la prima delle due affinché non influenzi l'altra.

A 5 µl di campioni sono aggiunti a 50 µl di soluzione substrato per la luciferasi di lucciola (*Luciferase Assay Reagent II*, LAR II) che viene quindi quantificata al luminometro in un periodo di dieci secondi, dopo un ritardo di tre che permette al segnale di stabilizzarsi. A seguire si aggiungono 50 µl di soluzione *Stop & Glo*[®] che allo stesso tempo è in grado di bloccare il segnale emesso dalla luciferasi di lucciola e attivare quella di Renilla, di cui si misura il segnale con gli stessi parametri usati precedentemente.

Poiché la luciferasi della lucciola ci dice quanto il promotore FoxO-dipendente è stato attivato mentre quella di renilla è indice dell'efficienza di trasfezione, il rapporto tra i due segnali è quello che identifica l'espressione dell'attività del promotore e può essere usato per paragonare diversi esperimenti.

2.12 ESTRAZIONE DELL'RNA

I muscoli Tibiale Anteriore dei topi su cui eseguire l'analisi vengono prelevati e congelati direttamente in azoto liquido. Previo trattamento con inibitore di RNAsi (*RNAse Zap*, *Invitrogen*) degli strumenti, i muscoli vengono polverizzati tramite pestellamento, la polvere così ottenuta viene risospesa in buffer di lisi e l'RNA estratto con kit commerciali (*SV Total Isolation System*, *Promega*)

2.13 ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA

La Real-Time PCR quantitativa è eseguita utilizzando la chimica del SYBR Green, un marcatore fluorescente che, una volta adagiato alla doppia elica di DNA, è in grado di emettere fluorescenza, restituendo un segnale proporzionale alla quantità di prodotto di amplificazione prodotto ad ogni ciclo.

Lo strumento per Real-Time PCR (*Applied Biosystem 7900Fast*) permette di rilevare i prodotti di amplificazione di PCR man mano che si accumulano durante la reazione, creando uno schema grafico dell'amplificazione, rappresentato da un grafico in cui sono rappresentati il segnale di fluorescenza rispetto al numero di cicli di reazione.

L'aumento della fluorescenza viene misurato rispetto al valore base calcolato nei primi cicli di amplificazione, in cui valori hanno minime variazioni. L'aumento rispetto ai cicli di base indica l'accumulo dei prodotti di PCR e segue uno schema esponenziale, il parametro Ct (*threshold cycle*) è definito come il numero di cicli in cui il valore di fluorescenza supera una soglia fissata, quindi più elevata è nel campione la quantità iniziale di RNA per il gene d'interesse, minore sarà il numero di cicli di amplificazione richiesti perché si superi il valore soglia, più basso sarà il valore di Ct.

2.13.1 Determinazione del livello di espressione

Per valutare le differenze di espressione genica ci siamo avvalsi di un metodo di quantificazione relativa (Pfaffl 2001). Questo metodo basa la determinazione dei livelli di espressione di un determinato gene mediante il rapporto tra un campione di test e un gene housekeeping, o gene di riferimento, nelle diverse condizioni sperimentali.

Il Rapporto di espressione relativa è calcolato basandosi sull'efficienza della PCR (E) e la deviazione dei cicli di soglia (ΔC_t) dei campioni in analisi, rispetto al controllo e rapportati agli stessi valori per il gene di riferimento.

L'equazione qui riportata rappresenta il modello matematico utilizzato :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_t}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_t}}$$

Il gene di riferimento utilizzato nei nostri esperimenti è GAPDH, in quanto si è visto che la sua quantità non varia nelle varie condizioni sperimentali testate

2.13.2 Disegno dei Primer

Con l'utilizzo del software presente sul sito Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) abbiamo disegnato delle coppie di primer che avessero caratteristiche precise, innanzitutto si sono utilizzate sequenze di esoni distinti, separati da un introne, in modo da evitare l'amplificazione del DNA genomico ed avere contaminazioni.

I primer sono stati disegnati nella regione al 3' del trascritto, ad una distanza tale da dare un amplificato di circa 200 paia di basi. La temperatura di melting è stata fissata tra i 58 o i 60°C.

Atrogin

For TGGGTGTATCGGATGGAGAC
Rev TCAGCCTCTGCATGATGTTC

GAPDH

Forw CACCATCTTCCAGGAGCGAG
Rev CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

2.13.3 Retrotrascrizione e sintesi del cDNA

400ng di RNA totale estratto dai muscoli (§2.12) sono stati retrotrascritti con la Reverse Transcriptase .

L'RNA viene addizionato in soluzione acquosa ai seguenti reagenti:

- Random Primer (50 ng)
- dNTPs (10mM ognuno)

Ogni mix viene quindi incubata per 5 minuti a 65°C, passaggio che aiuta a prevenire la formazione di strutture secondarie nell'RNA. Dopo un breve raffreddamento in ghiaccio, per permettere ai primer di allinearsi all'RNA templato si aggiungono alla reazione:

- Retrotrascrittasi (Superscript III)
- RNase Out (*Invitrogen*)
- DTT (50mM)
- Buffer della Retrotrascrittasi

Il Programma di reazione è il seguente:

Step1	25°C per 10'
Step2	42°C per 50'
Step3	70°C per 15'

Alla fine della reazione, il volume viene portato a 50ul aggiungendo acqua RNasi-free.

2.13.4 Reazione di Real-Time PCR

Lo strumento utilizzato è un ABI Prism 7900 Fast (*Applied Biosystem*).

In ogni pozzetto della piastra da 96 si utilizza 1µl del cDNA ottenuto con la retrotrascrizione, diluendolo in 4 µl di H₂O a cui si vanno ad aggiungere la mix del SYBR Green Power (*Applied Biosystem*) e i primer (50µM ognuno) per un volume totale di 10 µl.

Il Ciclo di PCR utilizzato per la Real-Time PCR è il seguente:

Step1	95°C per 15'
Step2	95°C per 25"
Step3	58°C per 1'

Ripetendo per 40 cicli gli step 2 e 3.

2.14 ANALISI STATISTICHE

I dati mostrati negli istogrammi sono espressi come medie ± errore standard sulla media (SEM), rappresentati come barre d'errore.

La significatività viene calcolata con il *test t* di Student a due code e due gradi di libertà, utilizzando un foglio di lavoro Excel, i valori P sono descritti nelle didascalie.

3. RISULTATI

Nella complicata serie di eventi che portano all'insorgere dell'atrofia muscolare, un ruolo centrale viene svolto dal fattore di trascrizione FoxO, che collega la via di segnale IGF-1/PI3K/AKT alle ubiquitina ligasi MuRF-1 e Atrogin-1, responsabili dirette dell'induzione della degradazione proteica.

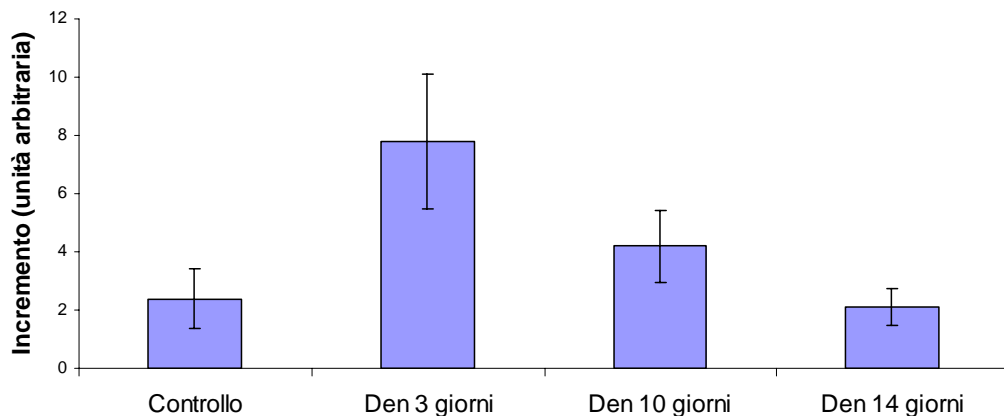
I fattori di trascrizione FoxO, inoltre, sono implicati in un vasta serie di processi che spaziano dalla regolazione della progressione del ciclo cellulare all'induzione di apoptosi, dalla riparazione dei danni al DNA alla risposta ai segnali di crescita. Non è dunque difficile capire come, studiarne la regolazione, abbia destato l'interesse di diversi gruppi.

Gli studi finora condotti sulle proteine FoxO sono riusciti a spiegare solo in parte come funzionano effettivamente. Per lo più gli sforzi iniziali sono stati diretti alla comprensione della modulazione della loro attività. Sono stati individuati tre diverse possibili modificazioni post-traduzionali, responsabili di altrettanti livelli di regolazione della funzione di FoxO, queste comprendono: fosforilazione, acetilazione e ubiquitinazione.

Si sa che la poli-ubiquitinazione delle proteine comporta la degradazione mediante la via del proteasoma (Plas 2003; Li 2003; Nandi 2006). È stato poi dimostrato che la fosforilazione di FoxO in specifici residui conservati di serina e treonina è implicata nella sua traslocazione tra nucleo, dov'è attivo, e citoplasma, dov'è inattivo. Il ruolo dell'acetilazione e le conseguenze che questa comporta rimangono più confuse e dipendenti dal tipo cellulare. Di conseguenza il nostro studio si è incentrato sui meccanismi che alterano l'attività di questo fattore di trascrizione una volta che FoxO si trova nel nucleo.

Abbiamo utilizzato la denervazione come modello di studio di atrofia (§ 2.10), in quanto è un modello sperimentale che ci permette di osservare in tempi brevi (due settimane) tutto il processo di atrofia, dal suo inizio, la sua fase acuta e il suo termine.

Abbiamo utilizzato l'espressione del gene Atrogin-1 (§2.13) come indice dell'attività dei fattori FoxO3. Come descritto in letteratura (Sacheck et al 2007) atrogin-1 viene indotta acutamente al terzo giorno, di denervazione per poi diminuire progressivamente fino a tornare a livelli pressoché basali dopo due settimane dalla sezione del nervo sciatico (Fig, 3.1).



Fig, 3.1: Espressione del gene Atrogin-1 in denervazione.

L'importante induzione e la successiva inibizione di atrogin-1 oltre a suggerirci i tempi di evoluzione dell'atrofia muscolare durante la denervazione, ci suggerisce che l'attività di FoxO3 viene regolata nei primi tre giorni in maniera positiva, portando ad un forte incremento dell'espressione di Atrogin-1, mentre durante la seconda fase del processo si osserva una progressiva diminuzione dell'espressione di questa ubiquitina ligasi, suggerendoci l'implicazione di meccanismi di regolazione inibitoria, il cui studio è lo scopo di questa tesi..

3.1 Indagini sull'acetilazione di FoxO3 in un modello cellulare

La maggior parte degli studi riguardanti il ruolo dell'acetilazione sono stati condotti su FoxO1 e sono incentrati sull'attivazione di FoxO in condizioni di stress ossidativo. La nostra attenzione si è concentrata su FoxO3 e sull'azione che quest'ultimo ha nel regolare l'atrofia muscolare. Abbiamo per prima cosa verificato se CBP/p300 potesse acetilare FoxO3 in cellule.

In tutti gli esperimenti è stata utilizzata una forma costitutivamente attiva di FoxO3 (FoxO3 TM), in cui i tre siti fosforilati da Akt, che ne comportano la ritenzione nel citoplasma (T32, S253, S315) sono mutati in alanine, non fosforilabili.

Per facilitare i processi di riconoscimento mediante anticorpi abbiamo usato un plasmide che codifica per una proteina di fusione tra FoxO3 ed un epitopo di emoagglutinina, HA, e un plasmide codificante la proteina p300 anch'essa fusa all'HA.

Cellule HEK 293 FT Sono state dunque trasfettate (§ 2.2) con HA-FoxO3 TM o cotrasfettate con HA-FoxO3 TM e HA-p300. Le proteine del lisato proteico ottenuto sono state separate mediante western blotting (§ 2.3) ed è stato rivelato il livello di acetilazione usando un anticorpo anti-acetil-lisina. Al fine di mantenere il livello di acetilazione stabile nel campione proteico abbiamo aggiunto al tampone di lisi cellulare gli inibitori delle de-acetilasi (10 mM Nicotinamide e 10 μ M Tricostatina A).

Come visibile in Fig 3.1 il livello di acetilazione in presenza di p300 risulta notevolmente aumentato, dimostrando che la presenza di p300 è direttamente correlata al livello di acetilazione di FoxO3 e che quindi questa acetilasi è in grado di acetilare il fattore di trascrizione.

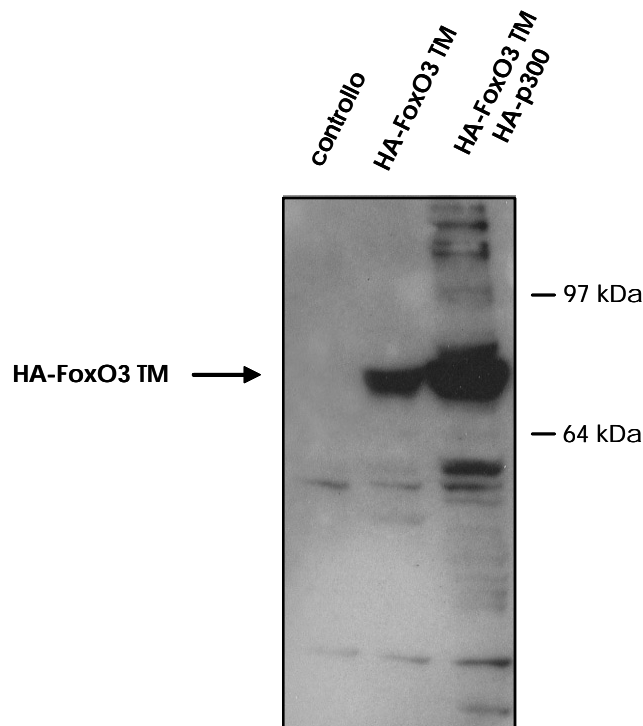


Fig. 3.2: Risultato del Western-blotting. Nella corsia di sinistra è stato caricato un campione di lisato cellulare non trasfettato usato come controllo; nella corsia centrale è riportato il campione trasfettato HA-FoxO3 TM; nella terza corsia il campione trasfettato con HA-FoxO3 TM e p300. A destra dei campioni è stato schematizzato il marcatore di peso molecolare usato (See Blue Plus2; Invitrogen). La freccia indica la proteina FoxO3 che presenta un peso molecolare di circa 70 kDa. Il blot è sviluppato con anticorpo anti-acetil-lisina (prodotto in coniglio) e con anticorpo secondario anti IgG di coniglio coniugato ad HRP.

Ci si è poi chiesti se l'azione osservata di p300 fosse dovuta ad una interazione diretta tra questi due, ovvero se fossero in grado di formare un complesso. Si sono quindi eseguiti degli esperimenti di co-immunoprecipitazione, utilizzando in parallelo lisati cellulari ottenuti da cellule trasfettate con HA-FoxO3 TM o cotrasfettate con HA-FoxO3 TM e HA-p300 che sono stati fatti precipitare con un anticorpo anti-FoxO3.

Il western blot caricato con questi lisati è stato sviluppato con un anticorpo diretto contro l'HA, permettendoci quindi di vedere la contemporanea presenza delle proteine di interesse.

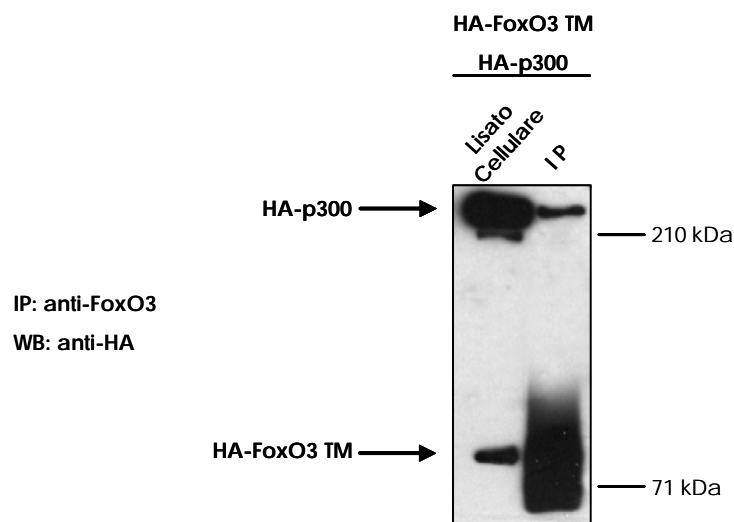


Fig.3.3: Risultato del western-blotting. In entrambe le corsie è stato caricato un campione proveniente da cellule trasfettate con HA-FoxO3 e HA-p300, a sinistra si trova il lisato cellulare non processato, mentre a destra è presente il lisato cellulare dopo immunoprecipitazione. L'immunoprecipitazione è stata eseguita con un anticorpo anti-FoxO3. A destra dei campioni è schematizzato il marker di peso molecolare utilizzato. IP: immunoprecipitazione, WB: western blot.

La Fig. 3.3 dimostra l'esistenza di un'interazione tra p300 e FoxO3, infatti si può vedere la presenza di p300 nel campione precipitato con anti-FoxO3. La prima conclusione che quindi si può trarre è che p300 e FoxO3 sono in grado di formare un complesso e che l'acetil transferasi (HAT) può potenzialmente modulare la funzione di FoxO3 acetilandolo.

3.2 Mutagenesi delle lisine acetilabili

Il bersaglio delle HAT, come detto (§ 1.5), sono i residui di lisina, presenti nella sequenza di FoxO3. Studiando l'acetilazione di FoxO3 durante condizioni di stress ossidativi si sono determinate quali lisine possono venire acetilate (Brunet 2004).

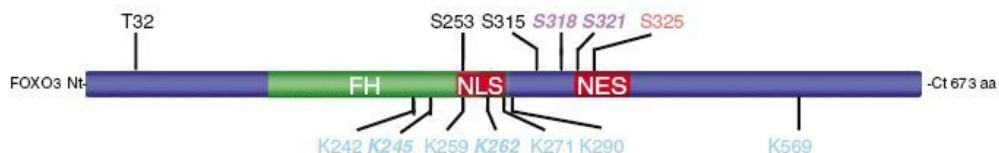


Fig. 3.4: Residui conservati di FoxO3 bersaglio di modificazioni post-traduzionali. Al di sopra della sequenza sono elencati i siti di fosforilazione, in nero i bersagli di AKT, in viola quelli di CK1. Al di sotto della sequenza, in azzurro, sono elencati i siti di acetilazione (modificato da Greer et Brunet 2005).

Cinque lisine sono bersaglio dell'acetilazione e si trovano in posizione 242, 259, 271, 290 e 569. Altre due lisine, in posizione 245 e 262, sono bersagli putativi per FoxO3, ancora oggetto di verifica, noti per essere acetitati in FoxO1.

I residui compresi prima dell'aminoacido 290 si trovano nel dominio di legame al DNA e nella sequenza di localizzazione nucleare (NLS), suggerendo un ruolo rilevante nel modulare l'attività di FoxO3.

Si è deciso di operare la mutagenesi delle lisine acetilabili, con lo scopo di ottenere dei mutanti in cui le lisine venissero sostituite con aminoacidi che impedissero o mimassero l'acetilazione. Dopo aver studiato la sequenza del cDNA di FoxO3 si è cominciato a disegnare i *primer* per la mutagenesi secondo stretti parametri per massimizzarne l'efficacia (§ 2.8).

Nel disegno dei *primer* in particolare è stato cercato di evitare che si formassero strutture secondarie, non solo tra i diversi *primer*, ma anche all'interno dello stesso, compito reso difficile dalle lunghe regioni ricche di coppie GC presenti nella sequenza di FoxO3. Dovendo poi utilizzare più *primer* alla volta si è dovuto prestare attenzione a far combaciare le diverse temperature di *melting* e di *annealing*. È stato quindi necessario uno studio accurato della sequenza per ovviare a questi problemi. La soluzione è stata trovata tenendo al centro del primer i nucleotidi da mutare, quindi non appaiabili, ed allungando lateralmente i primer fino ad ottenere la temperatura di *melting* voluta. Inoltre è stato possibile variare leggermente la sequenza del codone da mutare sfruttando la presenza di più codoni sinonimo per ognuno degli aminoacidi prescelti per la mutagenesi.

I primi mutanti sono stati progettati in modo tale che recassero mutazioni solo sulle lisine K242, K259 e K271, (3K), quelle comprese nel sito di legame al DNA, note essere acetilate in condizioni di stress ossidativo.

In un secondo tempo si sono aggiunte le mutazioni anche nei siti K245, K262 e K290, (6K). Per il momento si è trascurata la lisina 569, in quanto non direttamente coinvolta nel legame di FoxO3 al DNA e nei segnali di impor/export dal nucleo.

Nel disegno dei *primer* per la mutagenesi dei siti 245 e 262 abbiamo dovuto tener conto della loro vicinanza agli aminoacidi in posizione 242 e 259, che erano già stati mutati nel primo passaggio. Di conseguenza abbiamo dovuto disegnare la sequenza usando come modello non il FoxO3 TM, la sua forma già mutata in tre siti.

Sono stati creati due tipi di mutanti, uno in cui le lisine sono sostituite in arginine e l'altro con la sostituzione in glutamine, denominati rispettivamente 3KR-6KR e 3KQ-6KQ.

I mutanti per arginina posseggono dunque dei residui della stessa carica positiva delle lisine, ma non più acetilabili. Questi mutanti ci permettono di andare a studiare l'effetto del blocco dell'acetilazione, di questi

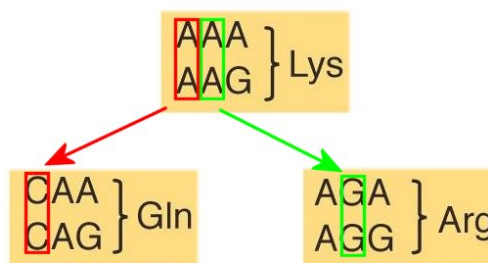


Fig. 3.5: Codice Genetico con evidenza delle triplette di lisina, glutamina e arginina. Le frecce indicano la mutazione puntiforme di una base per cambiare l'aminoacido.

residui, sulle capacità trascrizionali di FoxO. Al contrario la sostituzione con glutamina, neutralizzando la carica, mima uno stato di acetilazione costitutiva. Come evidente dal codice genetico (fig. 3.5) è sufficiente cambiare anche solo una base per ottenere la mutazione voluta, pur tuttavia in alcuni casi, per esigenze legate alla temperatura di *melting*, nel primer si sono dovuti cambiare due residui, questo però non ha causato problemi nell'appaiamento col *template* (es. AAG → AGA per la mutazione K259R).

Una delle teorie che ci ha portato a fare i due tipi di mutanti è che la mutazione in arginina dovrebbe comportare un aumento dell'attività trascrizionale dovuta alla maggior affinità di legame presente tra la carica negativa del DNA e tra un residuo dotato di carica sempre positiva, non mascherabile con l'acetilazione. Invece le attese per i mutanti KQ erano opposte, e si è supposta una diminuzione dell'attività di legame.

Test di attività promotoriale eseguiti *in vitro* su cellule trasfettate con mutanti di FoxO1, hanno dimostrato come la sostituzione KR sia in grado di indurre un aumento dell'attività trascrizionale, mentre la sostituzione KQ ha effetto opposto, inoltre l'effetto sulla trascrizione si fa più marcato con l'aumento da uno a tre dei siti mutati (Daitoku 2004; Matsuzaki 2005).

3.3 Studi in vivo dell'effetto dell'acetilazione sull'attività promotoriale

Abbiamo condotto gli studi con i diversi mutanti non su un modello di coltura cellulare ma trasfettando i muscoli di topi adulti. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su topi di ceppo C57/BL6 di sesso maschile, di circa 25-30 g di peso e dell'età di due mesi, il muscolo prescelto per la trasfezione è il Tibiale Anteriore.

I primi studi sono stati condotti al fine di esaminare l'effetto che l'acetilazione ha sull'attività trascrizionale di FoxO3. A questo scopo si è usato un plasmide codificante la proteina luciferasi di lucciola, la cui espressione è posta sotto il controllo di una sequenza promotoriale sintetica costituita dalla ripetizione di sei sequenze consensus (DBE) per il legame di FoxO (Forkhead Sensor, § 2.2).

Il muscolo adulto è stato trasfettato con la metodica dell'elettroporazione con tre costrutti per esperimento, infatti si sono utilizzate soluzioni contenenti oltre al sensore per l'attività di FoxO3, anche un plasmide per il controllo del livello di trasfezione (pRL-Null, §2.2), ed infine il plasmide con il mutante di FoxO3. I controlli negativi sono stati fatti utilizzando 10 µg di plasmide pcDNA3 al posto di FoxO3.

Le quantità di DNA usate sono mostrate nella tabella 3.1:

Costrutto	Quantità
FoxO3 (TM o mutanti)	10 µg
pRL-Null	5 µg
Forkhead Sensor	10 µg

Tab. 3.1: Quantità di DNA utilizzate per una singola trasfezione per saggio luciferasi

La soluzione finale comprendeva oltre al DNA plasmidico, NaCl 0,9% in un volume finale di 40 µl (gli altri parametri dell'operazione sono descritti al § 2.5).

Sette giorni dopo la trasfezione si prelevano i muscoli e si congelano in azoto liquido, per conservarli fino all'analisi (§ 2.7).

La lettura al luminometro del campione processato fornisce i valori di luminescenza emessa dalle due luciferasi ed il loro rapporto, che indica l'espressione dell'attività promotoriale.

Sono stati analizzati otto muscoli per ogni condizione da testare ed i risultati sono rappresentati schematicamente nel grafico di fig. 3.6 .

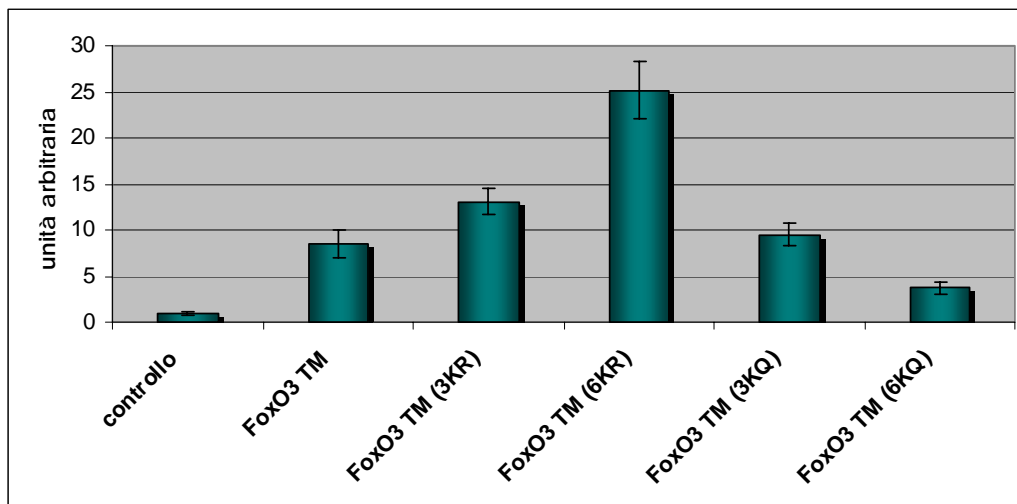


Fig. 3.6: Risultati dei test luciferasi condotti in vivo. I muscoli sono stati trasfettati con i mutanti elencati nel grafico e con un reporter sintetico per luciferasi di lucciola (Forkhead Sensor), era inoltre presente un reporter di controllo per luciferasi di renilla. Gli estratti muscolari sono stati analizzati per l'attività di entrambe le luciferasi. L'attività lucciola/renilla è stato normalizzato a 1.0 nel controllo con pCDNA3.

La prima osservazione che si può fare è che rispetto al valore di controllo la sovraespressione di un gene FoxO3, sia esso mutante o no, è in grado di indurre una forte attivazione del promotore DBE, dimostrando quindi la validità del sistema adottato.

Confrontando tra loro i valori delle varie forme di FoxO3 è possibile vedere che, rispetto ai valori di attivazione promotoriale forniti da FoxO3 TM, i mutanti non più acetilabili causano un'attivazione maggiore e che questa si fa più decisa con l'aumentare del numero di mutazioni, infatti c'è un incremento di oltre una volta e mezza tra TM e 3KR e di oltre tre tra TM e 6KR.

Questi dati quindi confermano quanto visto per FoxO1 in colture cellulari e rivelano che il meccanismo di base è comune alle due proteine nonostante i diversi ruoli svolti.

Si può inoltre supporre che, essendoci una buona differenza tra gli effetti sortiti da FoxO3 TM (3KR) e FoxO3 TM (6KR) anche i siti 245, 262 e 290 siano soggetti ad una regolazione post-traduzionale mediante acetilazione.

Ad ulteriore conferma del ruolo dell'acetilazione si può notare come i mutanti 3KQ e 6KQ che mimano un'acetilazione costitutiva abbiano una minor attività trascrizionale rispetto a FoxO3 TM.

La maggior attivazione promotoriale riscontrata nei muscoli trasfettati con FoxO3 TM (6KR) rispetto alla forma TM ci porta ad affermare che in condizioni in cui non sia possibile l'acetilazione dei residui di lisina di FoxO3 il fattore

trascrizionale sia molto più attivo, definendo quindi l'acetilazione come un tipo di regolazione adibita all'inibizione del legame tra la proteina ed il DNA.

3.4 Studi in vivo sull'atrofia muscolare

Ottenuti dunque dei risultati su un modello meramente promotoriale si è andati ad indagare quale potesse essere effettivamente l'importanza dell'acetilazione nell'indurre un programma complesso come quello dell'atrofia muscolare.

Si è deciso di fare delle nuove trasfezioni nel muscolo Tibiale Anteriore, andando questa volta ad indagare la capacità di indurre atrofia muscolare. La perdita di massa muscolare, dovuta alla degradazione proteica, è stata quantificata misurando la riduzione dell'area della sezione trasversale delle fibre muscolari.

Parallelamente a FoxO3 è stata trasfettata anche una GFP a localizzazione citoplasmatica che viene utilizzata come controllo della trasfezione e come indicatore della zona di trasfezione.

Sebbene la quantità totale di DNA trasfettato sia la stessa, variano le proporzioni rispetto a quanto visto per gli esperimenti di luciferasi.

Costrutto	Quantità
FoxO3 (TM o mutanti)	20 µg
pEGFP	5 µg

Tab. 3.2: *Quantità di DNA utilizzate in una singola trasfezione per esperimenti di immunostochimica.*

Dodici giorni dopo la trasfezione vengono prelevati i muscoli e vengono sezionati al criostato per ricavarne sezioni dello spessore di 6 µm. Le fibre sovra-esprimenti FoxO3 sono state identificate mediante immunofluorescenza usando un anticorpo diretto contro FoxO3. L'immunocomplesso è stato rilevato con un anticorpo secondario coniugato con Cy3, un fluoroforo rosso.

Per capire se l'acetilazione potesse avere un ruolo nell'influenzare la localizzazione di FoxO3 abbiamo colorato i nuclei con DAPI, per vedere effettivamente la disposizione della proteina FoxO all'interno della fibra.

L'analisi al microscopio a fluorescenza delle sezioni così trattate si è incentrata sulla ricerca di campi che presentavano fibre con una buona fluorescenza rossa a localizzazione nucleare, indice di un'efficiente trasfezione di FoxO3.

Si è misurata l'area della sezione delle fibre ritenute positive alla trasfezione (Scion Image; Scion Corporation NIH) e poi di quelle negative, per poterne fare un confronto.

Una volta ottenuta una numerosità sufficiente di fibre positive e negative, derivata dall'osservazione di muscoli diversi (almeno 5) si sono eseguiti dei calcoli statistici per ricavarne media ed errore standard, al fine di poter confrontare tra loro i diversi tipi di trasfezione.

I risultati ottenuti sono elencati in tabella 3.3 e riportati nel grafico di figura 3.7.

La rappresentazione grafica degli esperimenti riportata in figura 3.7 mostra l'effetto dei diversi mutanti sull'atrofia muscolare.

	Controllo	TM	3KR	6KR	3KQ	6KQ
Media	2371,12	902,42	1220,46	1257,73	1806,21	2008,27
Err. Std	32,09	35,69	35,63	104,05	58,37	156,29
% riduz.	/	62 %	49,5 %	47 %	23,8 %	15,3 %
T-test (vs. ctrl)	/	4,34 E-75	9,16 E-78	9,23 E-11	9,09 E-13	0,084

Tab.3.3: valori medi in μm^2 della sezione delle fibre. La riduzione si riferisce rispetto alle fibre negative. Il test indica la differenza significativa tra le fibre positive per la trasfezione col mutante e le fibre di controllo, non trasfettate.

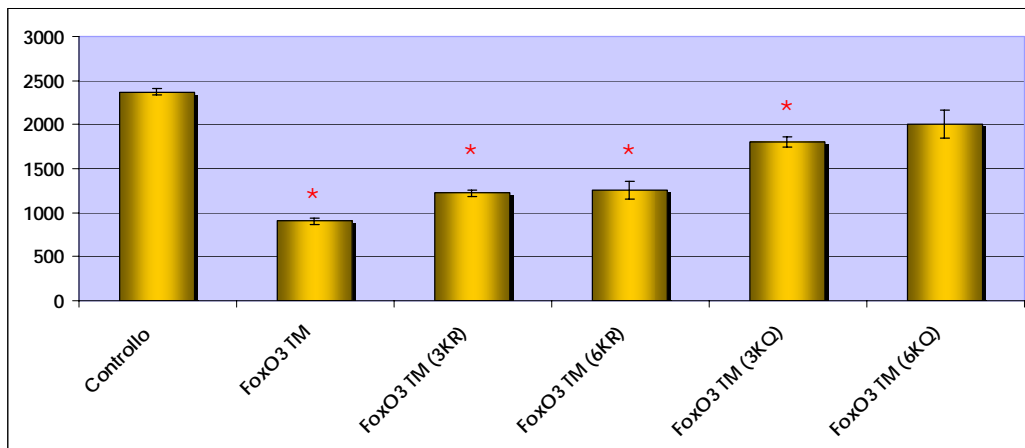
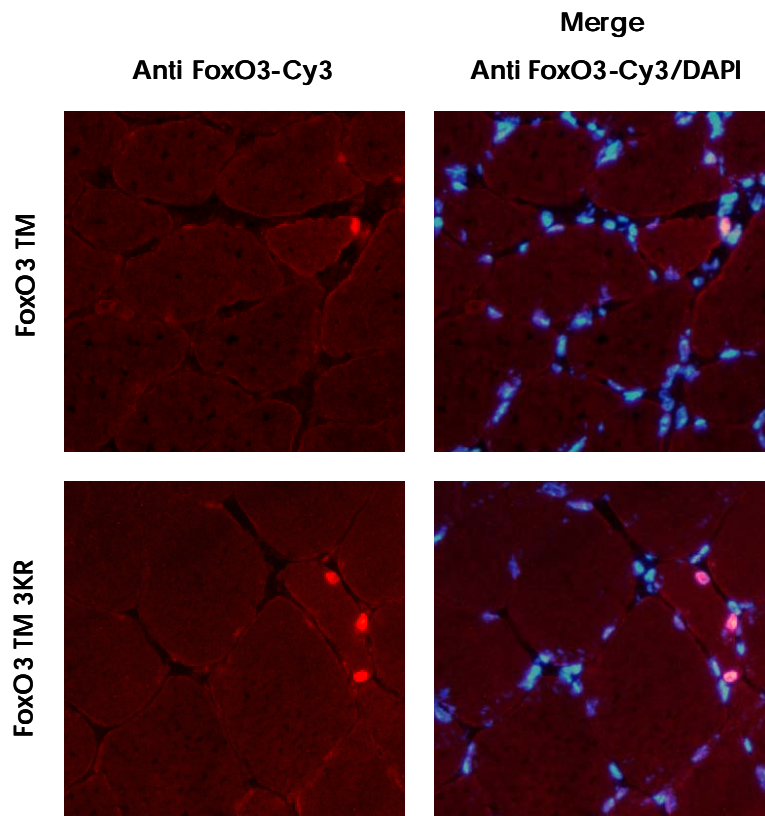


Fig. 3.7: Istogramma con le aree medie delle fibre. Gli asterischi indicano la presenza di differenza significativa calcolata col test *t* con un valore inferiore a 0,01.



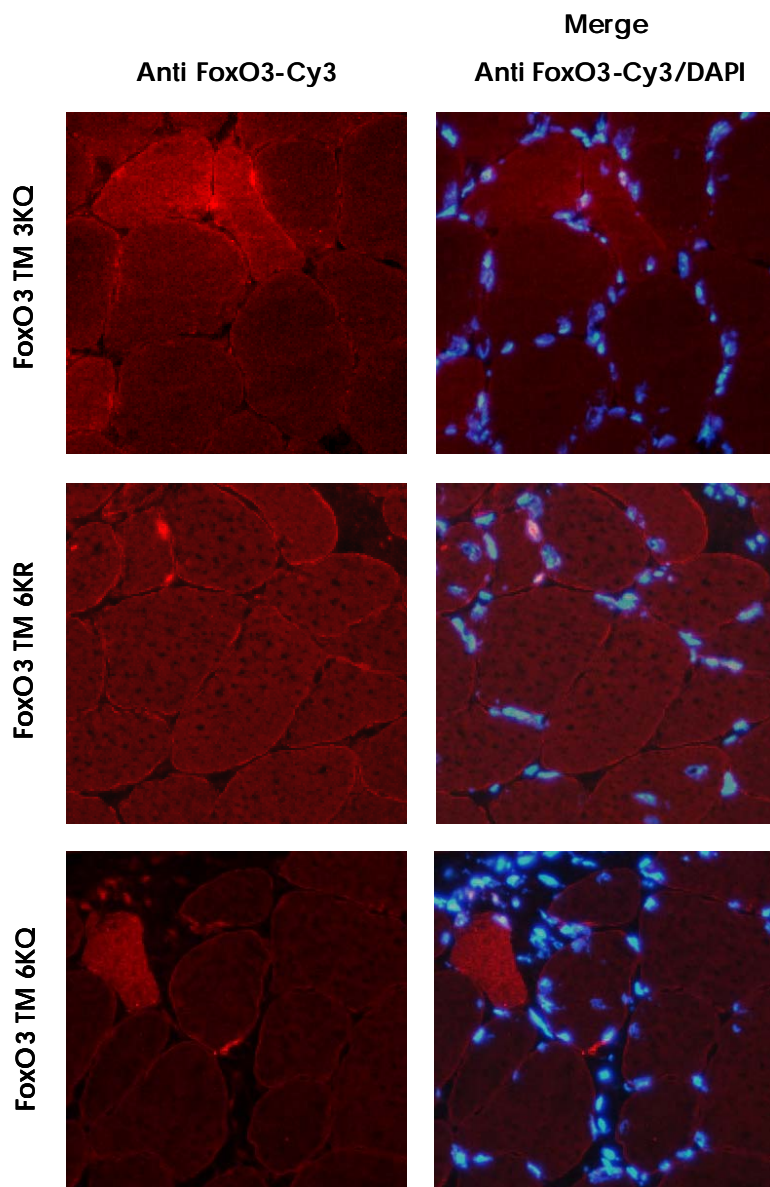


Fig. 3.8: Fibre esprimenti FoxO3. I pannelli a sinistra rappresentano le immagini prese al microscopio a fluorescenza di fibre trasfettate con i mutanti di FoxO3 rilevate con un anticorpo primario anti-FoxO3 ed un secondario coniugato ad un fluoroforo rosso, Cy3. I pannelli a destra invece riportano la sovrapposizione della fluorescenza rossa e della colorazione nucleare con DAPI (in azzurro).

L'analisi dei dati e delle immagini al microscopio a fluorescenza conferma che i diversi mutanti hanno una diversa capacità di indurre atrofia muscolare.

Infatti si noti come la forma più attiva nel causare perdita di proteine è costituita da FoxO3 TM (fig.3.8 in alto) in cui le fibre positive sono decisamente più piccole rispetto alle circostanti negative, riportando una riduzione delle dimensioni pari al 62%.

Le fibre trasfettate con i mutanti KR presentano comunque un'atrofia notevole, attorno al 47%, senza però esserci una differenza significativa (test t) tra il mutante 3KR e quello 6KR.

In condizioni in cui il fattore trascrizionale invece risulta sempre acetilato, come viene mimato dai mutanti KQ, l'induzione di atrofia muscolare risulta molto limitata, 23,8% per 3KQ e 15,3% per 6KQ, facendo ipotizzare un'inibizione della sua azione.

Questi dati si discostano parzialmente da quanto visto nel saggio di luciferasi, dimostrando che un aumento della capacità trascrizionale di FoxO3, rilevata come saggio luciferasi, non è sufficiente a comportare una maggior degradazione proteica. Tuttavia la riduzione della capacità trascrizionale dei mutanti che mimano l'acetilazione si riflette in una minore capacità di attivare il programma atrofico.

3.5 Studi in vivo sulla localizzazione di FoxO3 durante l'atrofia

Un'importante considerazione derivata dai precedenti esperimenti riguarda la localizzazione che assume il mutante 6KQ all'interno della fibra trasfettata.

Infatti, nonostante stessimo utilizzando un costrutto di FoxO3 privo dei residui bersaglio di AKT, che presenta quindi una localizzazione esclusivamente nucleare, un gran numero di fibre presentava una colorazione diffusa nel citoplasma della fibra (Fig. 38 in basso, 3.9).

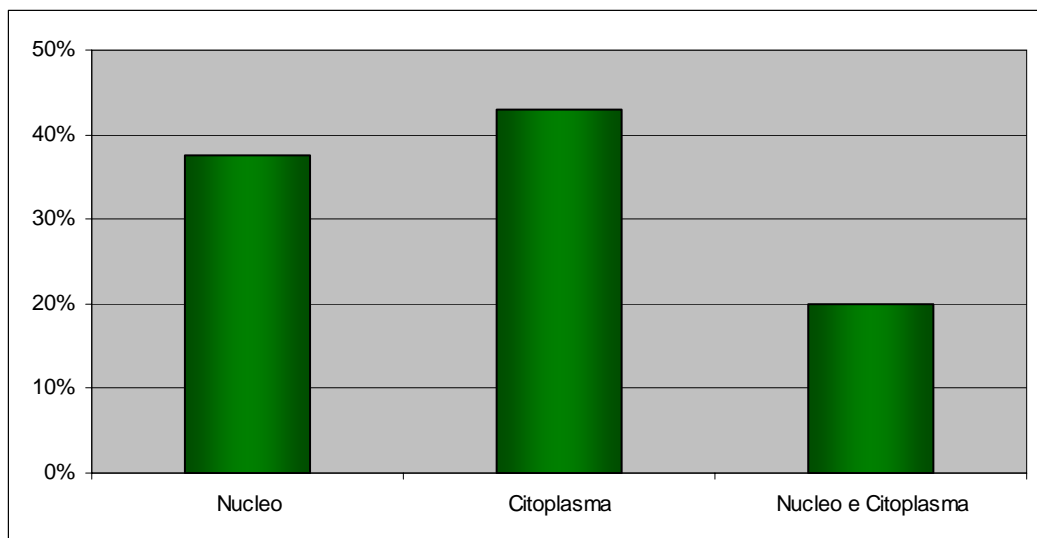


Fig. 3.9: Localizzazione di FoxO3 6KQ nelle fibre trasfettate al 12 giorno dalla trasfezione.

Supposto che il motivo di questa traslocazione fosse addebitabile allo stato di acetilazione mimata in tutti i residui, ci siamo chiesti se ci fosse in particolare un residuo specifico che svolgesse un ruolo di interruttore per la traslocazione al citoplasma di FoxO3.

Considerando che la localizzazione citoplasmatica cambiava drasticamente nel FoxO3 6KQ, ovvero quando nel FoxO3 3KQ si mutavano i tre siti K245, K262 e

K290, abbiamo indirizzato i nostri sforzi nel mutare singolarmente questi siti. Ci siamo focalizzati sul residuo K262 in quanto posto centralmente nel dominio NLS e conservato in tutte le isoforme di FoxO.

Nuovi esperimenti di immunofluorescenza ci hanno confermato come questo sia in effetti un residuo importante per la traslocazione citoplasmatica di FoxO3 (Fig. 3.10)

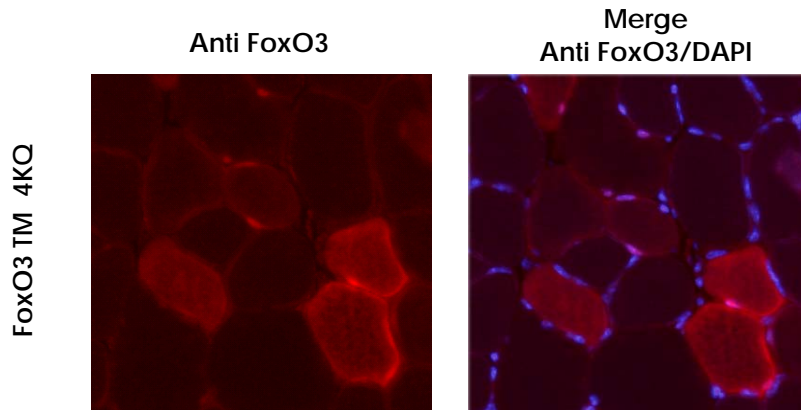


Fig. 3.10: Fibre esprimenti FoxO3 4KQ. La colorazione è la stessa della Fig. 3.8.

Ad ulteriore conferma della centralità svolta dal residuo K262 nell'esclusione nucleare abbiamo eseguito la mutazione singola di questo nella sequenza di FoxO3 TM ed abbiamo verificato come questa, da sola, sia sufficiente a determinare un cambio nella localizzazione della proteina nella fibra muscolare (Fig. 3.11)

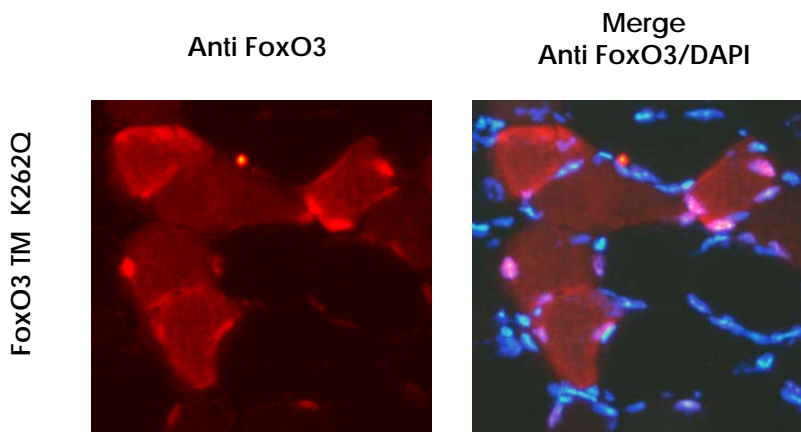


Fig. 3.11: Fibre esprimenti FoxO3 K262Q. La colorazione è la stessa della Fig. 3.8.

Anche in questo caso i muscoli presentavano una grande quantità di fibre che presentavano una localizzazione citoplasmatica di FoxO3.

3.6- Localizzazione citoplasmatica e degradazione

Un altro dato importante da considerare è il numero di fibre trafettate e riconosciute mediante gli esperimenti di immunofluorescenza. Infatti abbiamo osservato che, in muscoli prelevati allo stesso tempo dalla denervazione, il numero di fibre 6KQ positive era inferiore a quello di fibre positive per gli altri mutanti. Si è quindi deciso di provare a prelevare i muscoli a tempi minori, facendo un time-course che cominciava includeva otto, dieci e dodici giorni di denervazione, per capire se ci fosse una diminuzione della proteina FoxO3 6KQ che fosse tempo-dipendente.

Quello che abbiamo visto (Fig 3.12) è che, effettivamente, il numero di fibre che presentavano un localizzazione citoplasmatica per FoxO3 diminuiva drasticamente tra l'ottavo ed il decimo giorno di denervazione. Il dato suggeriva che la rilocalizzazione citoplasmatica fosse un requisito per la degradazione della proteina FoxO3

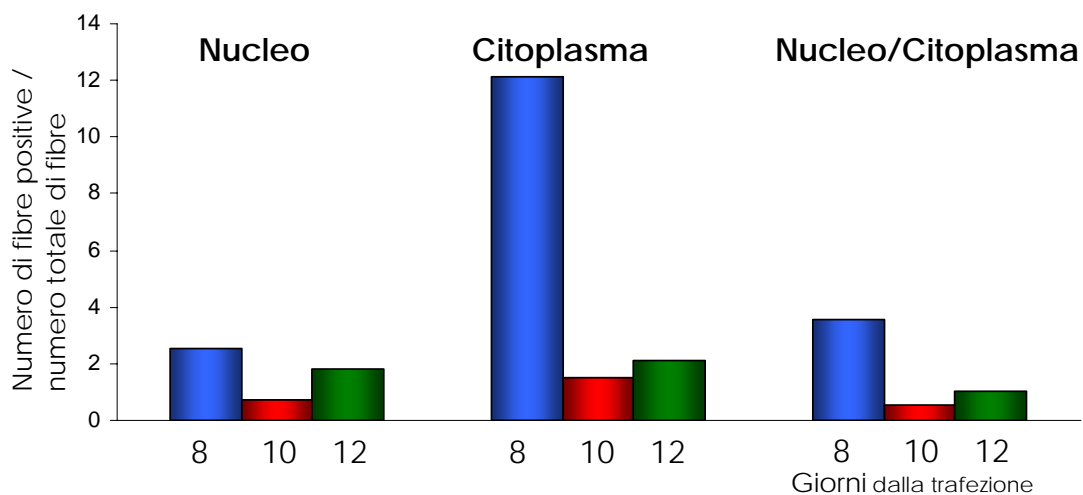


Fig. 3.12: Localizzazione di FoxO3 6KQ nelle fibre di muscoli trasfettati prelevati dopo 8 giorni (blue), 10 giorni (rosso) e 12 giorni (verde). Le colonne a sinistra rappresentano le fibre con localizzazione di FoxO3 6KQ solo nucleare, al centro quelle con localizzazione solo citoplasmatica, a destra la marcatura è visibile in entrambi i compartimenti.

Per indagare su questa possibilità abbiamo eseguito nuove trasfezioni con il mutante 6KQ trattando però gli animali con un inibitore del proteasoma l' MG262. Il trattamento è stato fatto dopo l'ottavo giorno ed i muscoli sono stati prelevati a 10 giorni. Abbiamo quindi contato le fibre che presentavano una localizzazione prevalentemente citoplasmatica per FoxO3 (§ 2.11).

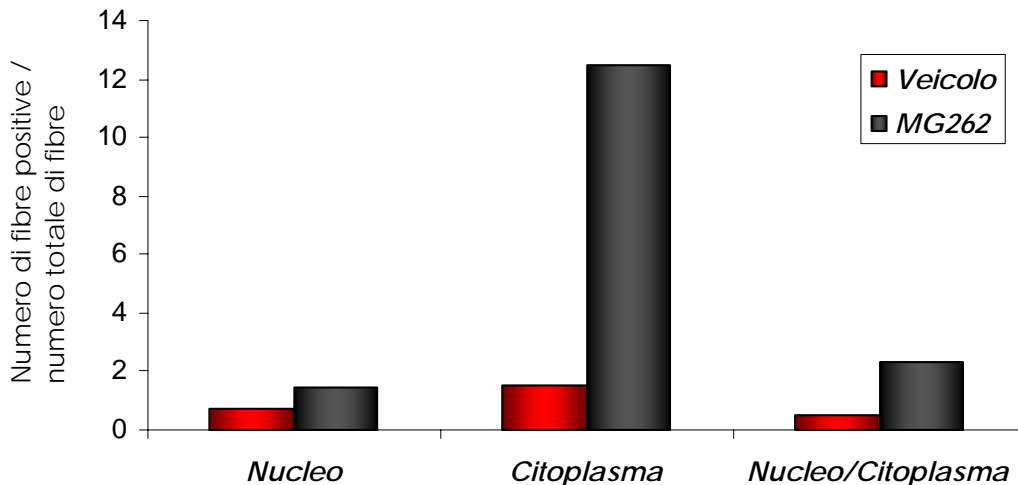


Fig. 3.13: Localizzazione di FoxO3 6KQ nelle fibre di muscoli trasfettati prelevati dopo 10 giorni, i topi trattati con MG (barre nere) sono paragonati ad un controllo, trattato con veicolo (DMSO, bande rosse)

Ciò che abbiamo visto è che nei topi trattati con l'MG262 si aveva un forte aumento del numero di fibre FoxO3-positivo a localizzazione citoplasmatica, indicando che la proteina veniva degradata dal proteasoma una volta rilocalizzata nel citoplasma. Infatti la localizzazione nucleare non veniva alterata dal trattamento con MG262. Questo dato indica che la rilocalizzazione citoplasmatica della proteina FoxO3 dovuta ad acetilazione rappresenta un primo passaggio verso la degradazione via proteasoma.

Dei tre tipi di mutanti a localizzazione citoplasmatica, K262Q, 4KQ e 6KQ, solo quest'ultimo andava incontro al processo degradativo, facendoci supporre che l'acetilazione del residuo 262 fosse di per se sufficiente per la rilocalizzazione citoplasmatica ma che richiedesse un'ulteriore acetilazione degli altri siti per la completa degradazione della proteina FoxO3. Quindi un possibile scenario considera la seguente ipotesi. In seguito a persistente attività di p300 le lisine acetilabili di FoxO3 vengono man mano modificate post-traduzionalmente diminuendo l'attività trascrizionale della proteina, fin quando viene acetilato il residuo 262, determinando quindi l'esclusione dal nucleo di FoxO3 e la rilocalizzazione citoplasmatica determina la sua degradazione, ponendo fine alla sua attività.

La presenza di acetilazione è stata inoltre analizzata mediante esperimenti di immunoprecipitazione e western blot (§ 2.4, 2.3).

L'atrofia è stata indotta mediante denervazione (§ 2.10), i muscoli sono poi stati prelevati a diversi tempi dall'operazione rispettivamente a tre, dieci e quattordici giorni, in modo da avere dei campioni che rappresentassero la fase acuta del programma atrofico, la fase calante e una fase tardiva, come rappresentato anche in figura 3.1.

Per disporre di un sufficiente quantitativo di proteina di partenza sono stati utilizzati i muscoli gastrocnemi e si sono eseguiti tre diversi tipi di immunoprecipitazione (IP). In un primo esperimento abbiamo immunoprecipitato FoxO3 allo scopo di determinare quale fosse la quantità di proteina FoxO3 presente nelle fibre durante il processo atrofico (Fig 3.14 A). Come si può notare dal western blot per FoxO3, la proteina è molto abbondante a tre giorni alla

denervazione, ovvero la fase acuta dell'atrofia, ma diminuisce progressivamente nei giorni successivi.

Di seguito è stata eseguita un'immunoprecipitazione usando un anticorpo che riconosce le catene di ubiquitina per immunoprecipitare tutte le proteine poliubiquitinate. Abbiamo poi rilevato la proteina FoxO3 per determinarne il livello di ubiquitinazione. Come ci si era aspettato FoxO3 viene fortemente ubiquitinato a dieci giorni, quando la sua quantità comincia a diminuire, e l'ubiquitinazione viene mantenuta, anche se ad un livello minore, anche a 14 giorni di denervazione. Questi dati sostengono i risultati ottenuti con l'inibitore MG262 e confermano che FoxO3 subisce un processo di ubiquitinazione al decimo giorno dalla denervazione, causando la sua degradazione da parte del proteasoma.(fig. 3.14 B). Infine, per confermare il ruolo svolto dall'acetilazione, abbiamo eseguito un'immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo che riconosce le lisine acetilate e abbiamo poi rilevato la proteina FoxO3 tramite western blot (fig 3.14 C). Anche in questo caso il livello di acetilazione aumentava al decimo giorno confermando la concomitanza tra acetilazione, ubiquitinazione e degradazione proteosoma-dipendente. I dati quindi sostengono la nostra ipotesi che indica l'uscita dal nucleo come il segnale per la degradazione

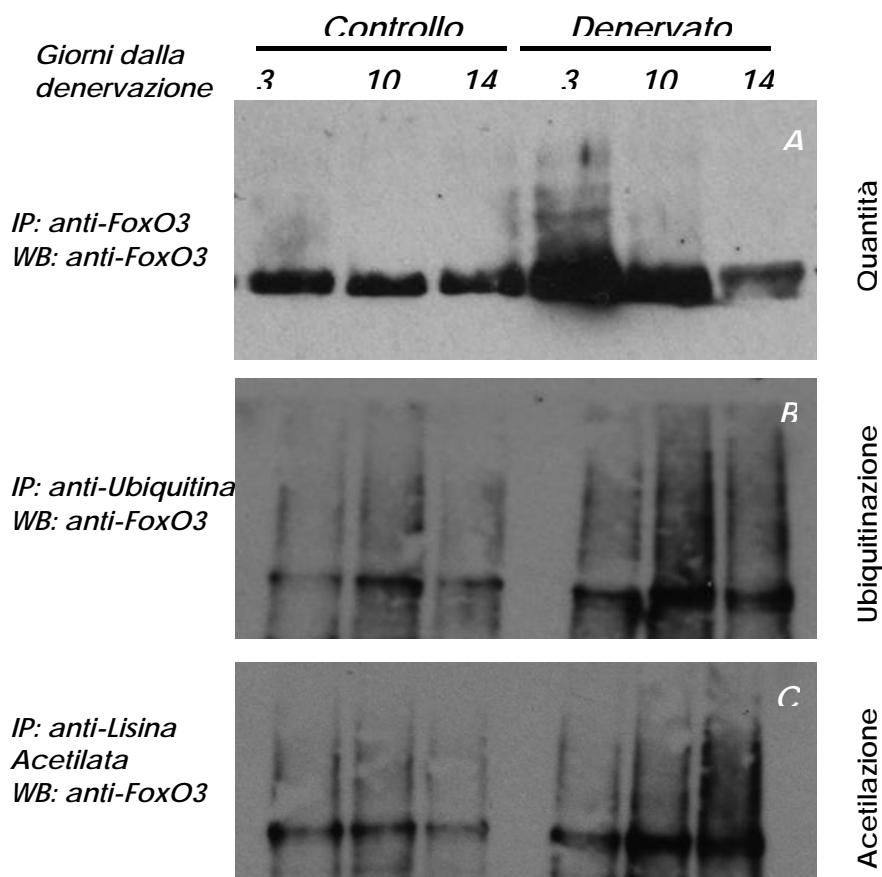


Fig. 3.14: Immunoprecipitazioni da muscolo gastrocnemio in denervazione e controllo. I campioni rappresentano muscoli prelevati a diversi giorni dalla denervazione. Tutti i blot sono stati sviluppati con anticorpi anti-FoxO3 ma da campioni immunoprecipitati con anticorpi diversi, rappresentano i livelli della proteina stessa (A, IP anti FoxO3) il suo stato di ubiquitinazione (B, IP anti-Ubiquitina) o il suo stato di acetilazione (C, IP anti-Lisina Acetilata).

4. DISCUSSIONE

La perdita di massa muscolare è una condizione debilitante che aggrava il quadro clinico di diverse patologie sistemiche e per la quale al momento non esiste alcuna terapia efficace che ne blocchi l'insorgenza dei sintomi. Tuttavia negli ultimi anni si sono fatti molti passi avanti nella comprensione di come il processo di atrofia muscolare si sviluppi e di quali siano i geni coinvolti; questo successo lo si è potuto ottenere grazie all'aiuto di nuove tecnologie. Infatti, lo studio del pattern di espressione dei geni durante le condizioni di atrofia attraverso la metodica dei microarrays, ha permesso di identificare due nuovi geni, codificanti per due ubiquitina-ligasi, responsabili della perdita di massa muscolare. In seguito, il perfezionamento delle tecniche di trasfezione ha consentito di determinare i fattori di trascrizione responsabili della regolazione delle ubiquitina-ligasi. Tuttavia ogni nuova scoperta riguardante la regolazione del processo di atrofia muscolare, apre ulteriori quesiti che necessitano altre risposte.

Infatti l'identificazione della famiglia dei fattori di trascrizione FoxO come responsabile dell'espressione delle ubiquitina-ligasi, Atrogin-1 e MuRF-1, e della perdita di massa muscolare potrebbe far supporre di aver trovato un buon bersaglio per lo sviluppo di farmaci atti a inibire FoxO e, di conseguenza, a bloccare la perdita di massa del muscolo scheletrico.

Tuttavia questa idea è solo parzialmente esatta, infatti lo sviluppo di un inibitore di FoxO potrebbe, da una parte, frenare la perdita di proteine muscolari, ma dall'altra potrebbe favorire l'insorgenza di tumori, di malattie autoimmuni e di altre patologie. Questo dualismo è dovuto al controllo che FoxO ha su molti aspetti della biologia cellulare come l'apoptosi, il ciclo cellulare, la gluconeogenesi, la sensibilità all'insulina e controlla questi processi biologici in maniera sia cellulo-specifica che tessuto-specifica.

Si capisce allora che l'approccio più corretto sarebbe quello di inibire specificamente l'interazione di FoxO con i promotori dei geni dell'atrofia nel muscolo scheletrico. Tuttavia questo modello implica una conoscenza dettagliata della regolazione di FoxO all'interno del nucleo della cellula muscolare e della sua interazione con i promotori dei geni dell'atrofia. Infatti un'ipotetica conoscenza dell'inibizione di FoxO, specifica per il promotore di Atrogin-1 nel tessuto muscolare, ci permetterebbe di avere dei target migliori su cui sviluppare farmaci efficaci e privi di effetti collaterali. Per raggiungere questo scopo ci siamo addentrati nello studio della regolazione che FoxO subisce mediante modificazioni post-traduzionali. Abbiamo quindi iniziato focalizzandoci sull'acetilazione, un meccanismo importante per modulare l'attività di fattori trascrizionali una volta che il fattore è nel nucleo.

Per identificare i siti acetilati di FoxO3 ci siamo, in prima istanza, basati sui dati presenti in letteratura. Identificare nuovi altri siti di acetilazione nel muscolo sarà uno degli obiettivi da verificare nel prossimo futuro. Abbiamo confermato mediante la tecnica di immunoprecipitazione su estratti di muscoli denervati che FoxO3 viene acetilato in questo modello di atrofia. Inoltre, in diverse condizioni di atrofia è presente uno stress ossidativo nelle fibre muscolari e questi siti sono acetilati proprio in condizioni di aumentato stress ossidativo, per cui il ragionamento su cui si basa la nostra ricerca è potenzialmente valido.

Per scoprire il ruolo dell'acetilazione dovevamo disporre di proteine che rappresentassero permanentemente i due estremi possibili, ovvero lo stato non

acetilato e lo stato acetilato. Si è dunque deciso di operare delle sostituzioni delle lisine acetilabili in arginine per ottenere una proteina in cui i residui non potessero venire acetilati, ma mantenessero la loro carica positiva al fine di studiarne l'importanza nell'interazione col DNA. Dalla parte opposta si è andati a mutare le lisine in glutamine, residuo privo di carica che quindi mima un'acetilazione costitutiva.

Per capire come funzionasse il meccanismo di acetilazione nella regolazione della trascrizione siamo andati ad condurre dei saggi luciferasi utilizzando un reporter sintetico costituito dalla sequenza per la proteina luciferasi posta sotto il controllo di un promotore composto da sei ripetizioni seriali della sequenza riconosciuta da FoxO.

I risultati ottenuti con i mutanti hanno confermato che l'acetilazione modula la capacità di FoxO3 di legarsi ad un plasmide. La diminuzione dei residui acetilabili induce un aumento dell'attività trascrizionale in maniera pressoché lineare, si è infatti osservato un aumento dell'attività trascrizionale di una volta e mezza quando si mutavano tre siti ed un incremento di tre quando si mutavano sei lisine. In contrapposizione i mutanti che mimavano l'acetilazione causavano una netta diminuzione delle capacità trascrizionali di FoxO3. Il dato conferma che la regione che regola il legame al DNA e l'import nucleare è sensibile a cambiamenti della carica elettrostatica causata dall'acetilazione.

Tuttavia questi dati sulle capacità trascrizionali di FoxO3 sono stati solo parzialmente confermati dagli esperimenti in vivo sulla capacità di FoxO3 e dei mutanti di coordinare un programma complesso come quello dell'atrofia muscolare. Infatti mentre i mutanti che mimano l'acetilazione hanno causato una riduzione dell'attività atrofizzante di FoxO3, i costrutti che bloccavano l'acetilazione non hanno esacerbato l'atrofia indotta da FoxO3. Una possibile spiegazione del motivo per cui il blocco dell'acetilazione non causa una maggiore perdita di proteine sta nel fatto che la cinetica di degradazione delle proteine è, probabilmente, già al massimo delle sue potenzialità. FoxO3 infatti è capace di indurre fortemente le ubiquitina-ligasi E3 Atrogin-1 e MuRF-1, ed essendo l'attività di questi enzimi regolata dalla presenza di molecole quali l'ubiquitina, i substrati e l'ATP un'ulteriore aumento della trascrizione di questi geni potrebbe non corrispondere ad un aumento della cinetica di reazione se non aumentano anche i fattori necessari per l'attività dell'enzima E3. Viceversa una riduzione dell'espressione delle ubiquitina ligasi comporta una diminuzione della degradazione proteica che si manifesta con un minor grado di atrofia.

Un altro fattore che dobbiamo tener presente e che potrebbe avere un peso nell'interpretazione dei risultati è che acetilazione ed ubiquitinazione convergono, potenzialmente, sugli stessi residui di lisina, diventando mutualmente esclusive. Quindi la mutazione dei residui acetilabili di lisina in forme non più acetilabili avrebbe influenzato il processo di ubiquitinazione. Se consideriamo che l'ubiquitinazione potrebbe avere un ruolo antagonista all'acetilazione, l'effetto della mancata ubiquitinazione sui residui mutati si manifesta maggiormente nei costrutti che non sono acetilabili piuttosto che in quelli che mimano l'acetilazione. Un fenomeno che abbiamo rilevato come possibile interazione tra acetilazione e ubiquitinazione in realtà è orientato alla poli-ubiquitinazione ed è stato osservato durante gli esperimenti di immunofluorescenza per determinare gli effetti dei mutanti nell'induzione di atrofia.

Infatti le trasfezioni del mutante 6KQ, che mima lo stato di iper-acetilazione risultavano atipiche per due parametri: il primo e più evidente, è che nonostante stessimo utilizzando una forma di FoxO3 a localizzazione nucleare, in quanto priva dei siti bersaglio di AKT, una buona parte delle fibre presentavano una localizzazione citoplasmatica di FoxO3, la seconda anomalia era data dalla scarsa quantità di fibre positive per questo mutante.

A questo punto abbiamo sviluppato un'ipotesi che potesse spiegare entrambi i fenomeni, ovvero abbiamo supposto che un elevato livello di acetilazione, come quello rappresentato dal mutante 6KQ fosse un segnale che determinasse l'esclusione di FoxO3 dal nucleo e che la rilocalizzazione citoplasmatica inducesse la sua degradazione, mediante proteasoma.

La nostra strategia di studio a questo punto si è focalizzata ad esplorare entrambe le possibilità, ovvero indagare sul meccanismo di esclusione nucleare e capire cosa succedesse a FoxO3 citoplasmatico.

Analizzando sui siti acetilabili che potessero fare di un mutante 3KQ nucleare un 6KQ citoplasmatico ci siamo soffermati sulla lisina 262 che, posta al centro del sito NLS poteva determinare la disattivazione del dominio se modificata, spiegando la rilocalizzazione. Abbiamo quindi mutato anche nel mutante 3KQ e abbiamo osservato che effettivamente la marcatura nelle fibre assumeva un pattern citoplasmatico. Un ulteriore esperimento di mutagenesi, questa volta mirato alla mutazione del solo residuo 262 ha dimostrato come questa da sola sia effettivamente in grado di determinare un'esclusione dal nucleo di FoxO3. Tuttavia nessuno dei questi due tipi di mutanti sembrava soffrire di una più corta emivita, come osservato per i 6KQ, suggerendoci che è quindi necessaria l'acetilazione di tutti i residui al fine di rendere FoxO3 un bersaglio per il proteasoma. Quindi il residuo 262 sarebbe l'ultimo sito acetilato ed agirebbe come interruttore determinando il livello di soglia oltre il quale l'acetilazione di FoxO3 determina la rilocalizzazione nel citoplasma e seguente degradazione.

Supponendo quindi che acetilazione e degradazione abbiano un andamento tempo-dipendente abbiamo eseguito il prelievo di muscoli trasfettati con il mutante 6KQ a diversi tempi. Abbiamo quindi potuto osservare che, anticipando il tempo dei prelievi, il numero di fibre marcate positivamente per FoxO3 aumentava progressivamente, e che la frazione che cresceva maggiormente era quella che presentava una localizzazione citoplasmatica. Avendo determinato che dieci giorni è un tempo critico per la degradazione abbiamo eseguito dei nuovi esperimenti, trattando i topi con un inibitore del proteasoma. Bloccando la degradazione abbiamo visto che la percentuale di fibre colorate positivamente nel citoplasma nei topi trattati con l'inibitore erano numericamente superiori rispetto ai quelle presenti nei topi di controllo, confermando l'ipotesi di una degradazione del FoxO3 citoplasmatico.

A supporto di questi dati abbiamo eseguito degli esperimenti sulla forma endogena di FoxO3, utilizzando come metodo di analisi l'immunoprecipitazione seguita da western blot su topi in cui l'atrofia è stata indotta mediante denervazione.

Quello che abbiamo visto è che la quantità di fattore trascrizionale FoxO3 presente al terzo giorno di denervazione, ovvero la fase acuta del programma atrofico, è notevolmente aumentata rispetto ai valori di controllo e che la proteina tende poi a diminuire progressivamente nei giorni successivi, fino a raggiungere il livello basale dopo due settimane dalla denervazione. Parallelamente i livelli di

ubiquitinazione di FoxO3 hanno un picco positivo al decimo giorno, indicando che effettivamente a quel punto c'è una forte degradazione della proteina, spiegando quindi il calo nei livelli di FoxO3 e determinando una riduzione nell'atrofia muscolare in questi giorni.

Questo meccanismo di regolazione permette di ridurre drasticamente il numero di proteine FoxO3 presenti per frenare il programma atrofico e mantenere un livello minimo di massa muscolare. L'utilizzo della denervazione come modello di atrofia ci permette quindi di riprodurre in tempi ragionevolmente brevi il processo atrofico dall'inizio al termine, potendo quindi osservare tutte le alterazioni che FoxO3 subisce al fine di regolarne finemente la sua attività. Ne consegue che siamo stati in grado di ricostruire un quadro in cui FoxO3 in ogni momento è regolato tramite multipli livelli di regolazioni post-traduzionali che ne controllano localizzazione, attività trascrizionale e quantità, determinando quindi una regolazione estremamente fine e plastica.

Ciononostante, in altri tipi di atrofia, il processo può subire accelerazioni o rallentamenti, in quanto tutti gli enzimi che agiscono negativamente su FoxO3 possono essere controbilanciati da altri fattori, come la de-acetilasi Sirt1 o la de-ubiquitinasi USP7/HAUSP, che possono mantenere o potenziare l'attività di FoxO fattore causando una eccessiva perdita di massa muscolare e portando alla cachessia.

L'aver ispezionato le diverse modificazioni post-traduzionali, le tempistiche e gli effetti di tali modificazione è importante per lo studio dei segnali molecolari che determinano la perdita della massa muscolare. Inoltre questo studio è il punto di partenza per lo sviluppo di terapie farmacologiche in grado di inibire o ridurre la perdita di massa muscolare e di forza in condizioni cataboliche.

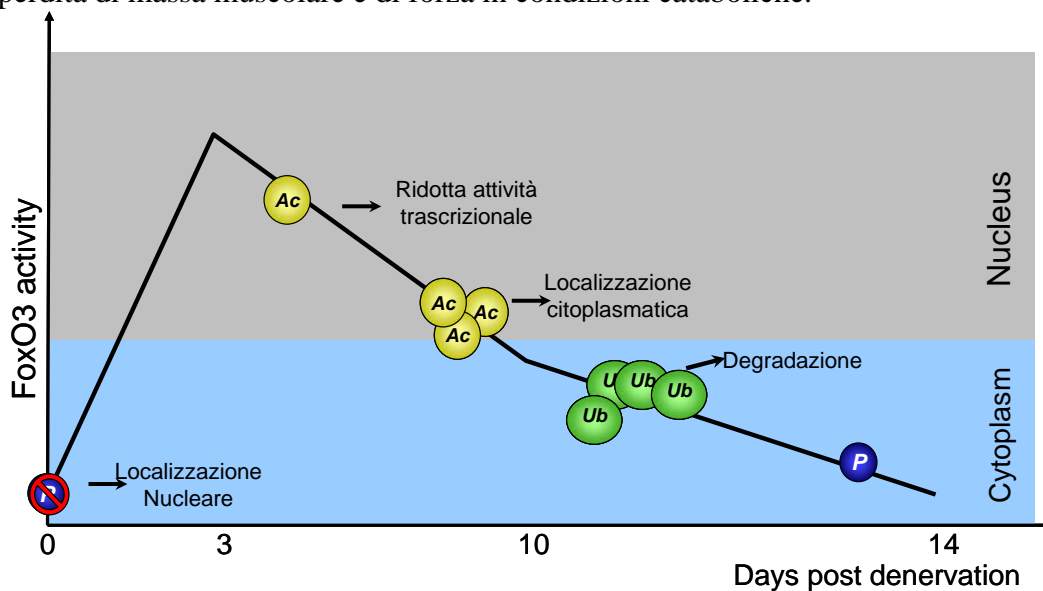


Fig. 4.1: Sequenza delle modificazioni post tradizionali che influiscono sull'attività e la localizzazione di FoxO3 durante l'atrofia indotta da denervazione .

5. APPENDICE

Sequenza di FoxO3 TM, in rosso sono riportate le lisine bersaglio della mutagenesi

gaattcggcagaggcaccggcttccccggccccgctctctccgctcgaagtggagctggacccg
gagttcgagccccagagccgtccgcgatcctgtgcgtggccccctgcaaagccggagctccaag
cgagccctgccaagccctcgggggagacggccgccgactccatgatccccgaggaggaggac
gatgaagacgacgaggacggcgggggacgggccggctcggccatggcgatcggcggcggcg
gcgggagcggcagctgggctccgggctgctccttgaggactcggccccgggtgctggcaccg
gagggcaagacccccgggtctgggcccagccaccggcggggcgggctgagcgggggtacaca
ggcgctgctgcagcctcagcaaccgctgccaccgccgagccggggggcggtgggggctccg
ggcagccgaggaaatgttcgtcgcggcggaacgcctgggggaaacctgtcctacgggacctgat
caccgcgccatcgagagctccccggacaaacggctcactctgtcccagatctacgagtggatgg
tgcgttgcgtgccctacttcaaggataagggcgacagcaacagctctgccggctggaagaactcc
atccggcacaacctgtcactgcatagtcgattcatgcgggtccagaatgagggaaactggcaagag
ctcttggatcatcaacctgatggggggagagcgggaaagccccccggcggcgggctgctc
gcaatggacaatagcaacaggtataccagagccgtggccgcgcagccaagaagaggcagcc
ctgcagacagccccgaatcagctgacgacagtcctcccagctctccaggtggcctggcagccc
cacgtcacgcagcagtgatgagctggatgcgtggacggacttccgttacgaccaatgtaacg
ccagcacagtcagtgccgcctgtcggccatcatggcaagcacagagttggatgaagtccaggac
gatgatgcgctctctcgccatgctctacagcagctcagccagcctgtcaccttcaagcaagc
cgtgcacggtggaactgccacggctgactgatatggcagggcaccatgaatctgaatgatgggctg
actgaaaacctcatggacgacctgctggataacatcacgctcccgccatcccagccatcgcctact
gggggactcatgcagcggagctctagcttcccgtataaccaccaagggtcgggcctgggctcccc
aaccagctccttaacagcacggtgttcggaccttcatctgaaactcctacgccagcttcccatgc
agaccatccaagagaacaagccagctaccttcttccatgtcacactatgtaaccagacactcca
ggacctgctcactcggactcacttagccacagcagtgatgatgacacagtcggaccccttgatg
tctcaggccagcaccgctgtgtctgccagaattcccggcgaacgtgatgcttcgcaatgatccg
atgatgtccttctgctgccagcctaaccagggagttggtaatcagaactgctccaccaccagca
ccaaaccagggcgctcttggtgagccgtgccttgcgaattctgtcagcaacatgggcttgagt
gagtcagcagccttgggtcagccaaacaccagcagcagctcctctcagccagctctatgcaaacc
ctctcggactctctcaggtcctcctgtactcaactagtcaaacctgcccgtcatgggcatga
gaagttccccagcagcttggacctggacatgttcaatgggagcttggatgtgacatggagtccatt
atccgtagtgaactcatggatgctgatgggttgatttaactttgattcctcctcaccacagaatg
ttgttggttgaacgtggggaacttactggtgctaagcaggcctcatctcagagctgggtgccagg
ctgatctagat

6. BIBLIOGRAFIA

- Birkenkamp K.U., Coffey P.J. (2003). Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans.* 31, 292-297.
- Bodine S.C., Latres E., Baumhueter S., Lai V.K., Nunez L., Clarke B.A., Poueymirou W.T., Panaro F.J., Na E., Dharmarajan K., Pan Z.Q., Valenzuela D.M., DeChiara T.M., Stitt T.N., Yancopoulos G.D., Glass D.J. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 294, 1704-1708.
- Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzalez M., Kline W.O., Stover G.L., Bauerlein R., Zlotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J.C., Glass D.J., Yancopoulos G.D. (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 3, 1014-1019.
- Biggs W.H. 3rd, Cavenee W.K., Arden K.C. (2001) Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome.* 12, 416-25.
- Brunet A., Kanai F., Stehn J., Xu J., Sarbassova D., Frangioni J.V., Dalal S.N., DeCaprio J.A., Greenberg M.E., Yaffe M.B. (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* 156, 817-828.
- Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., Hu L.S., Cheng H.L., Jedrychowski M.P., Gygi S.P., Sinclair D.A., Alt F.W., Greenberg M.E. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 303, 2011-2015.
- Cantley L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Daitoku H., Hatta M., Matsuzaki H., Aratani S., Ohshima T., Miyagishi M., Nakajima T., Fukamizu A. (2004). Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 10042-10047.
- Edmondson D.G., Davie J.K., Zhou J., Mirnikjoo B., Tatchell K., Dent S.Y. (2002). Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J Biol Chem.* 277, 29496-502.
- Frescas D., Valenti L., Accili D. (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem.* 280, 20589-95.

- Fu W., Ma Q., Chen L., Li P., Zhang M., Ramamoorthy S., Nawaz Z., Shimojima T., Wang H., Yang Y., Shen Z., Zhang Y., Zhang Y., Nicosia S.V., Zhang Y., Pledger J.W., Chen J. and Bai W. Mdm2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FoxO ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 284, 13987-14000.
- Fukuoka M., Daitoku H., Hatta M., Matsuzaki H., Umemura S., Fukamizu A. (2003). Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med.* 12, 503-508.
- Glass, D.J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 1974-84.
- Gomes M.D., Lecker S.H., Jagoe R.T., Navon A., Goldberg A.L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 14440-14445.
- Greer E.L. and Brunet A. (2005). Foxo transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 24,7410-7425.
- Huang H., Regan K.M., Wang F., Wang D., Smith D.I., van Deursen J.M., Tindall D.J. (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 1649-1654.
- Huo X., Zhang J. (2005). Important roles of reversible acetylation in the function of hematopoietic transcription factors. *J Cell Mol Med.* 9, 103-12.
- Jacobs F.M., van der Heide L.P., Wijchers P.J., Burbach J.P., Hoekman M.F., Smidt M.P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem.* 278, 35959-67.
- Komeili A., O'Shea E.K. (2001) New perspectives on nuclear transport. *Annu Rev Genet.* 35, 341-64.
- Lai K.M., Gonzalez M., Poueymirou W.T., Kline W.O., Na E., Zlotchenko E., Stitt T.N., Economides A.N., Yancopoulos G.D., Glass D.J. (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol.* 24, 9295-304.
- Latres E., Amini A.R., Amini A.A., Griffiths J., Martin F.J., Wei Y., Lin H.C., Yancopoulos G.D., Glass D.J. (2005) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem.* 280, 2737-44.
- Li Y.P., Chen Y., Li A.S., Reid M.B. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and

- E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285, 806-812.
- Mahmud D.L., G-Amlak M., Deb D.K., Plataniias L.C., Uddin S., Wickrema A. (2002). Phosphorylation of forkhead transcription factors by erythropoietin and stem cell factor prevents acetylation and their interaction with coactivator p300 in erythroid progenitor cells. *Oncogene* 21, 1556-1562.
- Matsuzaki H., Daitoku H., Hatta M., Aoyama H., Yoshimochi K., Fukamizu A. (2005). Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 11278-11283.
- Motta M.C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M., Guarente L. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell.* 116, 551-563.
- Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 31, 137-55.
- Nader, G.A. (2005). Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 1985-96
- Plas D.R., Thompson C.B. (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem.* 278, 12361-12366.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Rommel C., Bodine S.C., Clarke B.A., Rossman R., Nunez L., Stitt T.N., Yancopoulos G.D., Glass D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathway. *Nat. Genet.* 33, 401-406.
- Sacheck J., Ohtsuka A., McLary C., Goldberg A.L. (2004). IGF-1 stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin-ligase, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol* 287, 591-601.
- Sacheck J.M., Hyatt J.P., Raffaello A., Jagoe R.T., Roy R.R., Edgerton V.R., Lecker S.H., Goldberg A.L. (2007)- Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 21, 140-55.
- Sandri M., Sandri C., Cilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., Goldberg A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 117, 399-412.

- Schuur E.R., Loktev A.V., Sharma M., Sun Z., Roth R.A., and Weigel R.J. (2001) Ligand-dependent interaction of estrogen receptor with members of the Forkhead transcription factor family. *J Bio Chem.* 276,33554-33560.
- Skowyra D., Craig K.L., Tyers M., Elledge S.J., Harper J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell.* 91, 209-219.
- Spencer J.A., Eliazar S., Ilaria R.L. Jr, Richardson J.A., Olson E.N. (2000) Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol.* 150, 771-84.
- Sterner D.E., Berger S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 435-459.
- Stitt T.N., Drujan D., Clarke B.A., Panaro F., Timofeyva Y., Kline W.O., Gonzalez M., Yancopoulos G.D., Glass D.J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* 14, 395-403.
- Strahl B.D., Allis C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403, 41-45.
- van der Heide L.P., Hoekman M.F., Smidt M.P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* 380, 297-309.
- van der Heide L.P., Smidt M.P. (2005). Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem Sci.* 2, 81-86.
- van der Horst A., Tertoolen L.G., de Vries-Smits L.M., Fryre R.A., Medema R.H., Burgering B.M. (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem.* 279, 28873-28879.
- Vogt P.K., Jiang H., Aoki M. (2005). Phosphorilation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle.* 4, 908-913.
- Zhang X., Gan L., Pan H., Guo S., He X., Olson S.T., Mesecar A., Adam S., Unterman T.G. (2002). Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem.* 277, 45276-84.