

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

**DOTTORATO di RICERCA in
"BIOLOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE"**
2004 - XVI ciclo

TESI

***LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA È
ESSENZIALE PER L'INDUZIONE DELLO STATO
POSTMITOTICO DEL MUSCOLO SCHELETRICO,
MA NON PER IL SUO MANTENIMENTO***

Francesca Siepi

Docenti Guida ***Proff. P. Guerrieri e G. Melino***
Correlatore ***Dott. M. Crescenzi***
Esaminatori ***Proff. M. Castagnola, S. Dupré, M. Coletta***
Coordinatore ***Prof. Alessandro Finazzi-Agrò***

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E SCIENZE BIOCHIMICHE
VIA MONTPELLIER, 1- 00133 ROMA

A mia nonna Maria

"Fama di loro il mondo esser non lassa;
misericordia e giustizia li sdegna:
non ragioniam di lor, ma guarda e
passa."

Dante, Inferno III (49-51)

ABSTRACT

The retinoblastoma protein (pRb) plays a twofold role in the terminal differentiation of skeletal muscle cells. It is absolutely required for the establishment of the definitive mitotic arrest, or postmitotic state, that precedes skeletal muscle differentiation (1) and is necessary for optimal expression of tissue-specific genes (2). It is widely assumed that pRb is as critically required for the maintenance of the postmitotic state as for its inception, but this contention has never been tested. Here we show that terminal proliferation arrest is maintained in skeletal muscle cells by a pRb-independent mechanism. Rb conditional knockout myoblasts induced to terminally differentiate into myotubes while expressing pRb were subsequently subjected to acute Rb excision. In spite of complete pRb ablation, the myotubes did not carry out DNA synthesis, showing that pRb is not required for the maintenance of the postmitotic state in skeletal muscle cells. Rb-deleted myotubes re-expressed E2F transcriptional activity, cyclin-E and A associated kinase activity, PCNA, ligase I, RPA70, and MCM2, but remained nonetheless unable to synthesise DNA. A number of muscle-specific genes were significantly down-regulated, showing that the continuous presence of pRb is still necessary for their optimal expression in fully differentiated cells. Rb-deleted myotubes could be efficiently reactivated by forced expression of cyclin D1 and cdk4, indicating a functionally significant target other than pRb for these molecules. To determine whether such target is one of the pRb-related proteins or, regardless, whether the latter could partially substitute for pRb, we deleted Rb in myotubes devoid of the two other pRb family proteins. Rb removal resulted in no DNA synthesis, even in a pocket-protein null background. We conclude that the postmitotic state of myotubes is maintained by at least two mechanisms, one of which is pocket-protein independent.

ABSTRACT

Nel programma differenziativo muscolare la proteina del retinoblastoma (pRb) è richiesta per lo svolgimento del programma differenziativo, essendo assolutamente necessaria sia per il raggiungimento dello stato postmitotico che per l'espressione delle proteine muscolo specifiche. Sebbene non sia mai stato dimostrato, è opinione generale che poiché pRb è richiesta per l'uscita definitiva dal ciclo cellulare, la sua presenza continui ad essere fondamentale per il mantenimento dello stato postmitotico. Il proposito di verificare questa assunzione è stato perseguito utilizzando mioblasti knockout condizionali RbLoxP, che possono essere indotti a differenziare terminalmente in presenza di pRb, e solo successivamente sottoposti a delezione per sopprimere l'espressione della proteina. Nonostante la delezione determini la completa scomparsa di pRb, i miotubi non sintetizzano DNA, mostrando che pRb non è richiesta per la preservazione dello stato postmitotico in cellule muscolari scheletriche. Nonostante ciò, la rimozione di pRb determina la comparsa di attività trascrizionale di E2F, di attività chinasi associata alle cicline E ed A e di espressione della DNA ligasi I, di PCNA, di RPA70 e di MCM2. La presenza di pRb, pur non essendo essenziale per il mantenimento dello stato postmitotico, è ancora necessaria per l'ottimale espressione dei geni muscolo-specifici nei miotubi. La trascrizione di vari geni muscolari viene infatti significativamente ridotta nei miotubi Rb^{-/-}. Questi ultimi possono essere efficientemente indotti a sintetizzare DNA mediante l'espressione ectopica di ciclina D1 e di cdk4. Ciò indica fortemente l'esistenza di un altro bersaglio, oltre pRb, per queste molecole. E' stata indagata la possibilità che tale bersaglio potesse essere costituito da una o entrambe le altre proteine appartenenti alla famiglia di pRb, p107 e p130, che, in questo caso, si sostituirebbero a pRb nel mantenere lo stato postmitotico muscolare. Questa ipotesi è stata smentita dal fatto che la completa delezione di Rb in miotubi p107^{-/-}: p130^{-/-} non comporta sintesi di DNA, indicando che lo stato postmitotico è preservato in assenza di pRb e degli altri componenti appartenenti alla sua famiglia. E' possibile quindi concludere che lo stato postmitotico delle cellule muscolari scheletriche è mantenuto da almeno due meccanismi, uno dei quali è pRb-indipendente.

INDICE

ABSTRACT	
INTRODUZIONE	3
CAPITOLO 1. LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA E LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE "POCKET"	5
<i>La proteina del retinoblastoma</i>	5
<i>La struttura di pRb</i>	6
<i>La famiglia delle proteine "pocket"</i>	7
CAPITOLO 2. IL SOPPRESSORE TUMORALE PRB	9
<i>Meccanismi di inibizione della trascrizione realizzati da pRb</i>	9
<i>La proteina del retinoblastoma nella regolazione del ciclo cellulare</i>	11
CAPITOLO 3. LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA NEL DIFFERENZIAMENTO TERMINALE	15
<i>Il differenziamento di molti tipi cellulari dipende da pRb</i>	15
<i>La proteina del retinoblastoma nella regolazione dell'apoptosi</i>	18
CAPITOLO 4. LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA NEL DIFFERENZIAMENTO DEL MUSCOLO SCHELETRICO	19
<i>Il muscolo scheletrico: un modello di differenziamento terminale</i>	19
<i>pRb controlla le fasi finali del differenziamento muscolare</i>	20
CAPITOLO 5. RIATTIVAZIONE DEL CICLO CELLULARE NEI MIOTUBI TERMINALMENTE DIFFERENZIATI	25
<i>I miotubi rispondono alla stimolazione con siero</i>	25
<i>L'oncogene adenovirale E1A riattiva il ciclo cellulare nei miotubi terminalmente differenziati</i>	25
<i>Una seconda barriera</i>	27
<i>Riattivazione dei miotubi mediante espressione di geni cellulari</i>	28
<i>Esiste una terza barriera?</i>	30
<i>Soppressione dell'espressione dei geni muscolo specifici</i>	31
OBIETTIVI DI RICERCA	35
RISULTATI	37
<i>La delezione di Rb non induce sintesi di DNA nei miotubi terminalmente differenziati</i>	37
<i>La delezione di Rb nei miotubi terminalmente differenziati riattiva l'espressione di geni regolatori del ciclo cellulare</i>	44
<i>La costante presenza di pRb nei miotubi terminalmente differenziati è necessaria per l'ottimale espressione dei geni tardivi tessuto-specifici</i>	52

<i>Il complesso chinasi ciclina D1/cdk4 inattiva il meccanismo pRb- indipendente che ostacola la sintesi di DNA nei mitotubi ΔRb</i>	54
<i>Nessuno dei componenti della famiglia delle proteine "pocket" è responsabile del mantenimento dell'arresto proliferativo nei mitotubi terminalmente differenziati</i>	56
DISCUSSIONE	61
PROCEDURE SPERIMENTALI	67
<i>Anticorpi</i>	67
<i>Cellule e virus</i>	67
<i>Saggi di attività luciferasica</i>	68
<i>Microarray</i>	68
<i>Saggi chinasi</i>	68
<i>Generazione di mitotubi TKO</i>	69
REFERENZE	71
BREVE CV DEL CANDIDATO	85
LISTA DELLE PUBBLICAZIONI DEL CANDIDATO	91
COPIA DELLE PUBBLICAZIONI RILEVANTI DEL CANDIDATO	93

RINGRAZIAMENTI

Desidero in primo luogo ringraziare Marco Crescenzi, che mi ha accolto nel suo laboratorio appena laureata, trasmettendomi la passione per la ricerca e fornendomi gli insegnamenti fondamentali per svolgere questo lavoro. Desidero anche rinnovargli la mia gratitudine per avermi dato la possibilità di pubblicare i miei primi articoli scientifici e per avermi accompagnato fino a questo momento della mia carriera. Spero che sappia, o almeno immagini, che costituisce per me un punto di riferimento essenziale, direi unico, e che ricorrerò ai suoi consigli ed alla sua opinione chissà quante altre volte ancora. Non è possibile ringraziare Marco, senza includere sua moglie Silvia Soddu, che è il miglior modello di ricercatrice, in quanto donna, che io conosca.

Vorrei anche ringraziare il Prof. Gerry Melino per l'aiuto che mi ha dato quando ne ho avuto bisogno e per la lettura critica della mia tesi. Ringrazio inoltre il mio docente guida, il Prof. F. Guerrieri.

Un ringraziamento di cuore lo dedico ai miei carissimi colleghi ed amici Deborah Pajalunga, Alessandra Sacco e Alessandro Rufini, con i quali ho condiviso le gioie e i dolori dei miei primi passi nel mondo della ricerca. Ad Alessandro va un ringraziamento particolare visto che ha dovuto sopportarmi anche durante gli anni di laboratorio che hanno preceduto la laurea. A Deborah sono legata da un rapporto di amicizia e da un debito di gratitudine, sia per l'aiuto che mi ha offerto per inserirmi nel laboratorio, sia per il lavoro che ha svolto nell'ambito del lavoro descritto in questa tesi. Ad Alessandra auguro di trovare la strada che cerca da tanto tempo, ricordandole che è una persona meravigliosa....

Vorrei dedicare un ringraziamento particolare a Grazia Camarda, con la quale sono coautrice del lavoro presentato in questa tesi di dottorato. Il suo impegno è stato determinante ai fini della pubblicazione.

Un ringraziamento speciale lo dedico a Francesco Lozupone, un ricercatore ed amico straordinario, che ha il grandissimo dono di saper ascoltare e consigliare.

Sono enormemente grata a mia madre, mio padre e mio fratello Lorenzo che mi hanno accompagnato con tanta pazienza e affetto in questi anni. Li ringrazio moltissimo per la fiducia che ripongono in me e soprattutto per incoraggiarmi continuamente a vivere la mia vita come desidero. Mia nonna Maria, cui ho dedicato questa tesi, è stata la mia più vivace sostenitrice, non solo negli anni di studio, ma in generale nella vita.

Purtroppo lei è scomparsa, ma costituirà sempre la mia guida, i suoi consigli continueranno a riecheggiare nella mia testa ogni volta che ne avrò bisogno.

Infine ringrazio dal più profondo del cuore Matteo, il mio compagno. A lui dedico un infinito “grazie”, per non avermi mai fatto sentire in colpa ogni qualvolta ho dovuto anteporre il lavoro al nostro rapporto e per incoraggiarmi sempre a migliorare.

INTRODUZIONE

L'uscita definitiva dal ciclo cellulare, condizione nota come stato postmitotico, costituisce la caratteristica principale delle cellule terminalmente differenziate. Nonostante la maggior parte delle cellule di un mammifero adulto siano differenziate terminalmente, molto poco è noto circa i meccanismi molecolari che controllano l'irrevocabile uscita dal ciclo cellulare durante il differenziamento e il mantenimento dell'arresto proliferativo.

Negli ultimi dieci anni sono state accumulate molte evidenze riguardo al ruolo centrale svolto dalla proteina del retinoblastoma (pRb) nella regolazione delle fasi fondamentali del differenziamento terminale, che comprendono l'uscita definitiva dal ciclo cellulare, l'espressione dei marcatori tessuto-specifici, e l'acquisizione della resistenza all'apoptosi. (Lipinski and Jacks, 1999).

Le evidenze riguardanti il ruolo basilare svolto da pRb nei processi differenziativi di molti tipi cellulari sono il frutto di più di dieci anni di ricerche effettuate sia *in vivo* che *in vitro*. Oggi è comprovato il suo coinvolgimento nel differenziamento delle cellule muscolari scheletriche, eritrociti, neuroni, cellule del cristallino, adipociti, monociti/macrofagi, osteociti e cheratinociti. Le cellule muscolari scheletriche, oggetto di questa tesi, costituiscono uno dei sistemi terminalmente differenziati maggiormente studiati. Il muscolo scheletrico costituisce infatti un ottimo prototipo di differenziamento terminale e il suo processo differenziativo può essere riprodotto in coltura, semplicemente deprivando dei fattori di crescita i precursori mioblastici. Il muscolo scheletrico per queste sue caratteristiche ha consentito di ottenere alcune delle prime evidenze *in vitro* circa il ruolo chiave svolto da pRb nel controllo di entrambi gli aspetti fondamentali del differenziamento terminale, il raggiungimento dello stato post-mitotico e l'espressione dei geni tessuto specifici. Inoltre pRb sembra anche agire da coordinatore del differenziamento, controllando che gli eventi si susseguano ordinatamente, allo scopo di impedire che l'espressione dei fattori tessuto-specifici prevenga il raggiungimento dello stato post-mitotico (Schneider et al., 1994; Novitch et al., 1996; Andrés and Walsh, 1996; Lassar et al., 1994; Lipinski and Jacks, 1999).

Mentre disponiamo di un quadro abbastanza chiaro, anche se certamente

non completo, dei meccanismi molecolari che vengono innescati al momento dell'induzione dello stato postmitotico, sono ancora oscuri quelli che lo preservano a differenziamento completato. Fino ad oggi l'ipotesi più accreditata era che l'arresto definitivo della proliferazione fosse mantenuto dagli stessi meccanismi molecolari che lo inducono e che pRb svolgesse quindi un ruolo fondamentale anche nel contesto postmitotico. Tuttavia, come verrà argomentato successivamente, esistevano in letteratura evidenze che chiaramente indicavano il contrario e il lavoro svolto durante il dottorato di ricerca conferma questa visione.

CAPITOLO 1. LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA E LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE “POCKET”

LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA

pRb deve il suo nome al tipo di tumore che ne ha consentito l'identificazione, il retinoblastoma, una neoplasia che colpisce gli occhi dei pazienti pediatrici. Il gene Rb fu clonato proprio grazie alle frequenti mutazioni riscontrate a suo carico in questo tipo di tumore (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987). La sua attività di soppressore tumorale fu dimostrata reintroducendo pRb in cellule tumorali in cui era assente: diverse caratteristiche proprie del fenotipo maligno furono perse (Huang et al. 1988). Successivamente fu trovato mutato in molti altri tipi di neoplasie. Oggi è noto il coinvolgimento di pRb nella virtuale totalità dei tumori umani o perché è mutata essa stessa, o a causa di alterazioni a carico di fattori che ne controllano l'attività. (Lipinski and Jacks, 1999). pRb è stato il primo soppressore tumorale identificato, ed è un regolatore dell'omeostasi cellulare, essendo coinvolto nel controllo di funzioni cellulari critiche, che comprendono oltre al differenziamento, anche la proliferazione e la morte cellulare programmata.

Nella sua funzione di regolatore cellulare e di soppressore tumorale, pRb regola l'ingresso delle cellule nel ciclo cellulare bloccando l'espressione dei geni che controllano la progressione nella fase S del ciclo cellulare. Agisce in stretta prossimità del “punto di restrizione”, nella fase G₁ del ciclo cellulare, e la sua attività è regolata principalmente mediante fosforilazione. Nella forma ipofosforilata (attiva), pRb inibisce l'attività trascrizionale dei fattori E2F e, bloccando la trascrizione dei geni coinvolti nella transizione G₁-S del ciclo cellulare, arresta le cellule nella fase G₁ precoce. In presenza di stimoli proliferativi pRb viene fosforilata dai complessi chinasi ciclina D/cdk4-6, ciclina E/cdk2 e ciclina A/cdk2. Nella forma fosforilata, inattiva, pRb si dissocia dai fattori E2F, il blocco in G₁ viene conseguentemente rimosso, e le cellule possono procedere in fase S. Il livello di fosforilazione di pRb è quindi fondamentale nella corretta regolazione della sua attività; la forma iperfosforilata (inattiva) predomina nelle cellule proliferanti, mentre quella ipofosforilata (attiva) predomina nelle cellule quiescenti o differenziate.

LA STRUTTURA DI PRB

Il gene del retinoblastoma codifica una fosfoproteina nucleare di 928 aa (pRb) che contiene diversi domini funzionali, il più importante dei quali, è noto come dominio “*pocket*”. Quest’ultimo è costituito da due domini chiamati A e B, separati da una sequenza spaziatrice. I due domini A e B, interagendo, costituiscono una “tasca” (*pocket*), dalla cui integrità dipende il ruolo di pRb di soppressore tumorale. Mutazioni che alterano la struttura dominio “*pocket*” sono state infatti riscontrate nei pazienti affetti da retinoblastoma ereditario (Harbour and Dean, 2000a). Alcune oncoproteine virali, così come alcune delle molte proteine cellulari che interagiscono con pRb, contengono un motivo conservato LXCXE con il quale legano il dominio “*pocket*”. Quest’ultimo è stato cristallizzato legato ad un peptide di nove residui, contenente il motivo LXCXE, della oncoproteina E7 di papillomavirus. La struttura del cristallo ha rivelato che il sito di legame per il motivo LXCXE è localizzato nel dominio B. Il dominio A è richiesto perché il dominio B assuma una conformazione attiva; ciò spiega la elevata conservazione di entrambi. Molte altre proteine che interagiscono con pRb contengono un motivo LXCXE. Queste comprendono le istone deacetilasi, HDAC-1 e HDAC-2, e l’ATPasi BRG1, appartenente al complesso di rimodellamento della cromatina SWI/SNF (Harbour and Dean, 2000a).

Il motivo LXCXE di legame a pRb è sicuramente il più caratterizzato, ma non è certamente l’unico. I fattori trascrizionali E2F non contengono un motivo LXCXE e si legano a pRb in un sito distinto. Recentemente è stata risolta la struttura cristallografica del complesso costituito dal dominio “*pocket*” e dal frammento della proteina E2F1 (aa 409-426) fondamentale per l’interazione con pRb. La struttura mostra che E2F si lega all’interfaccia tra i due domini A e B e che stabilisce estese interazioni con residui conservati di entrambi. Ulteriori interazioni sono stabilite da E2F con il dominio carbossiterminale di pRb (Xiao et al. 2003). Ciò consente ad E2F di reclutare sui promotori, complessi contenenti pRb ed altre proteine, queste ultime contenenti un motivo LXCXE.

pRb contiene ulteriori siti di legame. HDAC-3, a differenza di HDAC-1 e HDAC-2 non contiene un motivo LXCXE, nonostante questo interagisce con pRb. BRG1, pur contenendo un motivo LXCXE, interagisce con pRb in altro modo; ciò consente l’interazione contemporanea di pRb con entrambi (Chen and Wang, 2000).

Un ulteriore dominio funzionale, distinto da quello di legame di E2F, è

localizzato nella regione carbossi-terminale di pRb. Questa regione contiene siti di legame per la tirosina chinasi c-abl e per MDM2. L'attività tirosina chinasi di c-abl è bloccata quando è complessata con pRb. Questa interazione sembra essere importante per il ruolo di pRb di soppressore della proliferazione, e sembra coinvolgere anche E2F. c-abl viene rilasciata dal complesso in forma attiva, quando pRb viene fosforilata (Harbour and Dean 2000a).

L'interazione di pRb con MDM2 influenza la sensibilità delle cellule alla morte cellulare programmata. MDM2 è un regolatore dell'attività apoptotica di p53. In assenza di stimoli pro-apoptotici, ne inibisce la trascrizione e ne media la degradazione mediante interazione diretta. pRb può formare complessi trimerici con p53 e MDM2 e, inibendo l'attività proapoptotica di MDM2, prevenire la degradazione di p53.

Nella regione amino-terminale di pRb sono stati identificati i siti consenso per le chinasi cdk, che formando complessi attivi con le cicline, fosforilano pRb, inattivandola, in risposta a stimoli proliferativi. Oltre a svolgere un ruolo regolatorio la regione N-terminale contiene siti di legame per ulteriori proteine cellulari, tra cui MCM7, una chinasi regolatoria della transizione G₂-M (Harbour and Dean, 2000a).

LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE "POCKET"

pRb condivide una elevata omologia di sequenza con due proteine, p107 e p130. Le tre proteine costituiscono la "famiglia pRb" anche chiamata, per motivi di omologia di struttura di seguito descritti, la famiglia delle proteine "*pocket*".

p107 e p130, come pRb, contengono un dominio "*pocket*", da cui dipendono la maggior parte delle loro attività. L'analisi della sequenza genica ha evidenziato una maggiore omologia di sequenza tra i geni *p107* e *p130* (circa il 50% di identità) che tra questi e il gene *Rb* (circa il 35% di identità). La somiglianza tra *Rb* e *p107/p130* è concentrata nel dominio "*pocket*". Mentre pRb ha in comune con le altre una ridotta omologia al di fuori dei due domini A e B, p107 e p130 condividono un'elevata identità di sequenza nella regione di connessione tra A e B. Quest'ultima è fondamentale per il legame di p107 e p130 con ciclina E /cdk2 e con ciclina A/cdk2 (Lipinski and Jacks, 1999).

Le tre proteine "*pocket*", oltre alla struttura condividono molte funzioni.

Analogamente a pRb, p107 e p130 legano oncoproteine virali e i fattori trascrizionali E2F. Inoltre entrambe inibiscono promotori responsivi a E2F, reclutano HDAC reprimendo attivamente la trascrizione e, quando overespresso, bloccano la progressione nel ciclo cellulare (Harbour and Dean, 2000a). In conclusione, nonostante il ruolo di soppressore tumorale sia stato dimostrato solo per pRb, p107 e p130 spartiscono con essa molte funzioni, sia nell'ambito della regolazione del ciclo cellulare, sia del differenziamento terminale (Lipinski and Jacks, 1999).

CAPITOLO 2. IL SOPPRESSORE TUMORALE pRB

La transizione G₁-S è uno dei passaggi del ciclo cellulare più delicati in quanto da essa dipende il controllo della proliferazione cellulare. Le cellule in cui tale controllo è perso possono incorrere nella trasformazione neoplastica caratterizzata da proliferazione incontrollata, non supportata da stimoli proliferativi.

pRb svolge la sua attività di soppressore tumorale nella media fase G₁, reprimendo la trascrizione dei geni coinvolti nella regolazione della progressione in fase S. pRb non lega direttamente il DNA, quindi svolge il suo compito di repressore della trascrizione genica interagendo ed inibendo l'attività di alcuni fattori trascrizionali. Tra questi i più studiati appartengono alla famiglia dei fattori trascrizionali E2F. Siti di legame per i fattori E2F sono stati identificati nei promotori di molti geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare come le cicline D1, E ed A, p107, E2F1, 4 e 5, cdk2 e cdc2 ed enzimi coinvolti nella sintesi del DNA, come la timidina chinasi, la deidrofolato reductasi, la DNA polimerasi α e cdc6 (Lipinski and Jacks, 1999). La famiglia E2F comprende sei elementi, ognuno dei quali può formare eterodimeri con i componenti della famiglia DP. Gli elementi della famiglia Rb mostrano preferenze di legame diverse con i fattori E2F: pRb predilige E2F1-5, mentre p107 e p130 legano E2F4 e 5. E2F6 non lega nessuna delle proteine "pocket" e la sua funzione è sconosciuta (Lipinski and Jacks, 1999).

MECCANISMI DI INIBIZIONE DELLA TRASCRIZIONE REALIZZATI DA pRB

pRb utilizza almeno due meccanismi per reprimere la trascrizione genica. Nel primo caso, interagendo e mascherando il dominio di transattivazione di E2F, pRb ne inibisce l'attività trascrizionale. Nel secondo caso pRb complessato con E2F può attivamente reprimere la trascrizione reclutando fattori di rimodellamento della cromatina (Harbour and Dean, 2000a).

La modificazione della struttura della cromatina mediante acetilazione/deacetilazione degli istoni è un importante meccanismo di regolazione dell'espressione genica. Le istone acetiltransferasi (HAT) sono associate con vari fattori trascrizionali e, acetilando gli istoni, modificano

la struttura della cromatina, rendendola accessibile all'apparato trascrizionale. Al contrario, le istone deacetilasi (HDAC), rimuovendo i gruppi acetile dagli istoni, alterano la cromatina inibendo la trascrizione. La famiglia HDAC comprende sette membri, di questi HDAC1-3 (le HDAC di classe I) interagiscono con pRb. Quest'ultima lega simultaneamente HDAC e E2F, rendendo possibile il reclutamento del complesso HDAC-pRb-E2F sui promotori dei geni regolatori del ciclo cellulare (Harbour and Dean, 2000b).

Sono state raccolte molte evidenze riguardanti l'importanza del ruolo di HDAC nel controllo della trascrizione da parte di pRb e degli eventi di acetilazione e deacetilazione nel controllo dell'attività trascrizionale di E2F. In particolare è stato dimostrato che alcuni mutanti di pRb che non legano HDAC1 e HDAC2 non sono in grado di inibire attivamente la trascrizione di alcuni geni e di mantenere l'arresto proliferativo (Luo et al. 1998). Inoltre è stato evidenziato che E2F-1 è in grado di legare le istone acetiltransferasi p300/CBP e p/CAF (Trouche et al., 1996) e che l'acetilazione di E2F aumenta l'affinità di legame tra E2F e DP e il legame del complesso al promotore (Martinez-Balbas et al., 2000). Sulla base di questi risultati è possibile ipotizzare che le HAT legate da E2F promuovano, acetilandolo, il suo legame al promotore, e acetilando gli istoni, impediscano la formazione dei nucleosomi, rendendo la cromatina accessibile alla trascrizione. Le HDAC, reclutate da pRb, al contrario, deacetilando E2F, potrebbero inibire il suo legame al DNA e, deacetilando gli istoni, rendere la cromatina inaccessibile all'apparato di trascrizione (Harbour and Dean, 2000a).

pRb interagisce anche con BRG1 e BRM, due ATPasi costituenti il complesso umano di rimodellamento della cromatina SWI/SNF, identificato inizialmente in lievito. Questi complessi influenzano l'accesso dei fattori di trascrizione sui promotori alterando la posizione dei nucleosomi e quindi lo stato di condensazione della cromatina, in maniera dipendente dall'ATP. La reazione catalizzata è reversibile, in quanto questi complessi sono in grado altrettanto bene di assemblare e disassemblare nucleosomi in un tratto di DNA. Alcune evidenze indicano che pRb può reclutare contemporaneamente HDAC e BRG1/BRM nel complesso con E2F (Zhang et al., 2000). Un recente modello integra l'attività di HDAC e SWI/SNF nella regolazione della trascrizione. Secondo questo modello, il complesso SWI/SNF assicura una continua oscillazione tra formazione e distruzione dei nucleosomi. Le HAT, legate a E2F, potrebbero utilizzare la conformazione "rilassata" dei nucleosomi come bersaglio per

l'acetilazione e fissarli in una struttura inattiva. Al contrario, le HDAC reclutate da pRb, rimuovendo i gruppi acetile, renderebbero instabile la conformazione inattiva dei nucleosomi, che verrebbero riassemblati nello stato attivo. Quindi sarebbe l'equilibrio tra l'attività di HDAC e di HAT nelle vicinanze di SWI/SNF a determinare se SWI/SNF facilita o inibisce la trascrizione (Harbour and Dean, 2000a).

Da quanto detto è evidente che la regolazione dell'espressione genica mediata da pRb è estremamente complessa. Uno degli aspetti che richiedono ulteriori indagini riguarda il contributo *in vivo* dei due meccanismi di inibizione della trascrizione (legame diretto e mascheramento del dominio di transattivazione di E2F e coinvolgimento dei fattori di rimodellamento della cromatina). In particolare è ancora da stabilire se le interazioni con HDAC e SWI/SNF siano necessarie per la repressione della trascrizione mediata da pRb o se questi corepressori consentano a pRb di reprimere la trascrizione di specifici geni in corrispondenza di determinati momenti del ciclo cellulare o in particolari condizioni fisiologiche (Harbour and Dean, 2000c).

LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Normalmente le cellule completano la fase G₁ e progrediscono nella fase S quando pRb viene fosforilata e inattivata dai complessi chinasi ciclina/cdk, in risposta ad opportuni stimoli proliferativi. Una volta fosforilata, pRb diviene inattiva e consente la progressione nel ciclo cellulare, principalmente rilasciando i fattori E2F. pRb contiene 16 siti di fosforilazione e durante il ciclo cellulare oscilla tra forme ipofosforilate e iperfosforilate. Almeno tre complessi chinasi fosforilano pRb durante la progressione del ciclo cellulare. Ciclina D/cdk4-6 fosforila pRb nella fase G₁ precoce, ciclina E/cdk2 nella fase G₁ tardiva e ciclina A/cdk2 mantiene pRb fosforilata durante la fase S. La progressiva fosforilazione di pRb determina la progressione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Le chinasi che fosforilano pRb sono controllate a diversi livelli da vari meccanismi, il più noto dei quali coinvolge due gruppi di molecole inibitorie, le famiglie INK4 e Cip/Kip. La famiglia INK4 consiste di quattro membri, chiamati in base al loro peso, p15, p16, p18 e p19. Gli inibitori appartenenti alla famiglia INK4 interagiscono in maniera specifica con le chinasi cdk4 e 6, dipendenti dalla ciclina D, e quando sono

legati ad esse prevengono la formazione dei complessi con la ciclina attivatrice. Gli inibitori Cip/Kip includono p21, p27 e p57 e hanno capacità di legame sia con i complessi ciclina-cdk, sia con le sole cicline, in entrambi i casi inibendone l'attività chinasi (Sherr and Roberts, 1999). In G₀ pRb non è fosforilata e quindi è attiva. L'iniziale fosforilazione da parte di ciclina D1/cdk4 converte pRb in una forma ipofosforilata, ma ancora attiva. Sono necessarie successive fosforilazioni ad opera delle chinasi cdk4/6 e del complesso ciclina E-cdk2 nella tarda G₁, per convertire pRb nella forma iperfosforilata, inattiva. Recentemente è stato chiarito il motivo della necessità di due complessi chinasi per la fosforilazione completa di pRb (Harbour et al., 1999; Zhang et al., 1999). In base ai dati raccolti, il complesso ciclina D1-cdk4-6, fosforilando specifici siti di pRb, promuove il rilascio di HDAC dal dominio "pocket". È stato proposto che l'allontanamento di HDAC impedisca a pRb di reprimere la trascrizione del gene codificante ciclina E (Harbour et al., 1999; Zhang et al., 1999). L'espressione di ciclina E così indotta sarebbe sufficiente al superamento del blocco in G₁ e quindi alla progressione in fase S (Zhang et al., 1999). Questo modello (Fig. 1 A) spiegherebbe anche perché il complesso ciclina D1-cdk4-6 non è necessario per la progressione nel ciclo cellulare se la ciclina E è espressa costitutivamente o prematuramente (Geng et al., 1999).

Nonostante pRb sia nota principalmente per il suo ruolo di bloccare le cellule in fase G₁, esistono evidenze sempre più numerose che il ruolo di pRb si estenda ben oltre nel ciclo cellulare. L'espressione ectopica di un mutante di pRb resistente alla fosforilazione è in grado di bloccare la sintesi di DNA in cellule che abbiano superato il punto di restrizione in G₁ (Knudsen et al., 1998). pRb è infatti in grado di regolare la progressione nella fase S mediante la sua interazione con il complesso SWI/SNF (Zhang et al., 2000). Il complesso HDAC-Rb-SWI/SNF è richiesto per inibire l'espressione di ciclina E e l'ingresso in fase S. L'accumulo di ciclina E e la formazione dei complessi ciclina E-cdk2, secondo il modello proposto porterebbe alla inattivazione del complesso pRb-SWI/SNF mediante la fosforilazione di pRb e/o BRG1. Quest'ultimo evento permetterebbe l'accumulo di ciclina A e cdc2. Il complesso pRb-SWI/SNF non è in grado di arrestare le cellule in G₁ una volta che HDAC è stato dislocato dal complesso, ma è in grado di impedire che le cellule escano dalla fase S. Le cellule di conseguenza endoreduplicano il DNA fino ad un contenuto >4N. È stato proposto che questa anomalia sia attribuibile al fatto che il complesso pRb-SWI/SNF impedisce l'espressione di ciclina A e cdc2

necessaria all'attivazione di ciclina B-cdc2 in fase M. Bartek e collaboratori hanno dimostrato l'esistenza di un collegamento tra pRb/E2F e ciclina B-cdc2 (Lukas et al., 1999). Il complesso ciclina B-cdc2 è necessario per l'ingresso in mitosi; i livelli di ciclina B sono mantenuti bassi durante la fase S dal complesso APC (anaphase promoting complex), che con la sua attività di ubiquitina ligasi ne causa la degradazione. Alla fine della fase S ciclina A-cdk2 inattiva il complesso APC fosforilando la subunità Cdh1 e, permettendo l'accumulo di ciclina B e la formazione del complesso ciclina B-cdc2, favorisce la progressione nella fase M del ciclo cellulare (Fig.1 B) (Lukas et al., 1999)

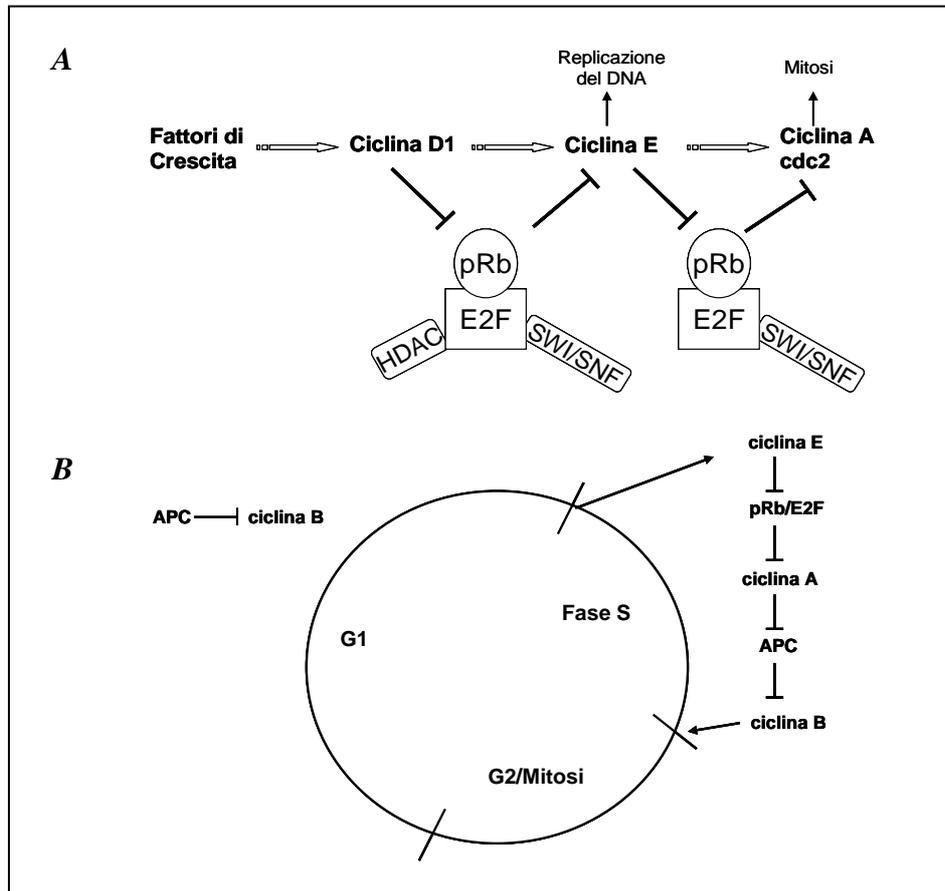


Figura 1. A) Ruolo potenziale svolto dai complessi di rimodellamento della cromatina nella regolazione della progressione nelle diverse fasi del ciclo cellulare. B) I complessi pRb/E2F e ciclina A/cdk2 controllano l'ingresso in mitosi regolando l'attività di APC e la formazione del complesso chinasi ciclina B/cdk2

CAPITOLO 3. LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA NEL DIFFERENZIAMENTO TERMINALE

Il differenziamento è il processo grazie al quale le cellule precursore acquisiscono una specializzazione funzionale e una morfologia, specifiche del tipo cellulare. Nei mammiferi la maggior parte dei tessuti sono differenziati terminalmente. La caratteristica principale delle cellule terminalmente differenziate, quali le muscolari scheletriche e cardiache, gli adipociti, i cheratinociti e i neuroni è l'uscita definitiva dal ciclo cellulare. A differenza delle cellule quiescenti, le cellule terminalmente differenziate non sono in grado di sintetizzare nuovamente DNA, anche se sottoposte a condizioni di crescita ottimali.

Il programma differenziativo segue uno schema comune: le cellule precursore vengono indirizzate a differenziare verso uno specifico tipo cellulare da fattori differenziativi precoci. In alcuni tessuti l'espressione di tali fattori non preclude un periodo di espansione clonale. Nei tessuti terminalmente differenziati, al contrario, le cellule precursore escono definitivamente dal ciclo e, solo una volta divenuti post-mitotici iniziano ad esprimere geni tessuto-specifici. L'acquisizione del fenotipo differenziato procede con l'acquisizione di modificazioni morfologiche caratteristiche del tipo cellulare e di una maggiore resistenza all'apoptosi (Lipinski and Jacks, 1999).

Più di dieci anni di ricerche hanno permesso di identificare in pRb uno dei principali responsabili del processo differenziativo di un numero di tipi cellulari tuttora già elevato e, probabilmente, destinato ad aumentare ulteriormente.

IL DIFFERENZIAMENTO DI MOLTI TIPI CELLULARI DIPENDE DA pRb

Le prime indicazioni riguardo al ruolo di pRb nel differenziamento e nello sviluppo embrionale, sono state ottenute dal fenotipo di topi Rb^{-/-}. Nel 1992, tre gruppi indipendentemente dimostrarono che i topi Rb^{-/-} muoiono in utero tra il tredicesimo e il quindicesimo giorno di gestazione (E13-15), mostrando una maturazione difettiva degli eritrociti e dei neuroni (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). Due anni dopo, un più attento studio del fenotipo dei topi Rb^{-/-}, ha rivelato che era

anche compromesso il differenziamento del cristallino, dove venne evidenziata una eccessiva proliferazione, ridotta espressione dei fattori del differenziamento, e apoptosi (Morgenbesser et al., 1994). L'analisi del fenotipo dei topi Rb^{-/-} non fornì ulteriori informazioni, ma successivi studi *in vitro* consentirono l'identificazione di molti altri tipi cellulari il cui differenziamento dipende da pRb. Per esempio la grave compromissione del differenziamento del muscolo scheletrico fu scoperta *in vitro* nel 1994 (Schneider et al., 1994) e confermata solo due anni dopo in topi con un fenotipo solo parzialmente difettivo per pRb (topi Rblox/Rb^{-/-}) (Zacksenhaus et al., 1996). Analogamente, pRb si è rivelata essenziale anche per il differenziamento degli adipociti (Chen et al., 1996a; Classon et al., 2000). Anche questa scoperta fu fatta *in vitro*, e non è stata confermata *in vivo*.

Difetti meno evidenti sono stati identificati in altre linee cellulari per le quali non è stato descritto un fenotipo particolare *in vivo*. Come per gli eritrociti, anche il differenziamento delle cellule ematopoietiche è influenzato da pRb. Nel 1996 è stato riconosciuto il coinvolgimento di pRb nel differenziamento dei monociti/macrofagi (Chen et al., 1996b); successivamente la scoperta fu confermata *in vivo* mediante soppressione diretta di pRb (Bergh et al., 1999; Ji et al., 2004). Esistono anche evidenze riguardanti il ruolo di pRb nella regolazione del differenziamento dei granulociti (Bergh et al., 1999; Gery et al., 2004).

Sono stati identificati anche altri tipi cellulari che richiedono di pRb per il loro normale processo differenziativo. Nel 2001 è stato riconosciuto il coinvolgimento di pRb nel differenziamento degli osteoblasti (Thomas et al., 2001). In questo lavoro è stato delineato le basi molecolari di una vecchia osservazione epidemiologica: l'osteosarcoma è uno dei più comuni tipi di cancro che colpisce i sopravvissuti al retinoblastoma familiare (Fletcher et al., 2004). I topi Rb^{-/-} condizionali hanno consentito di identificare il ruolo, precedentemente non riconosciuto, di pRb nel differenziamento dei cheratinociti. Questi topi, nel 2003, hanno consentito anche di rilevare difetti nell'architettura della placenta (Wu et al., 2003). Questa evidenza spiega, almeno in parte, il fatto che alcune delle anomalie a carico degli eritrociti e del sistema nervoso centrale sono "cellula-indipendente" come dimostrato nelle chimere Rb^{-/-}: Rb^{+/+} (Williams et al., 1994; Maandag et al., 1994). L'ipotesi avanzata recentemente prevede che la morte degli embrioni a metà gestazione e parte dei difetti di differenziamento derivino dall'ipossia conseguente alle gravi anomalie riscontrate nell'architettura della placenta degli embrioni Rb^{-/-}.

(MacPherson et al., 2003; Wu et al., 2003). Inoltre queste recenti scoperte indicano che il differenziamento di un altro tipo cellulare, i trofoblasti, possa dipendere da pRb.

Il differenziamento di pochi tipi cellulari è stato dimostrato indipendente da pRb. Per esempio quello dell'epitelio della ghiandola mammaria. Cellule di topi Rb^{-/-} trapiantate in femmine *wild-type* formano ghiandole mammarie normali, sia dal punto di vista istologico che funzionale (Robinson et al., 2001). Lo stesso equivale per l'epitelio della prostata (Day et al., 2002). La storia dei topi Rb^{-/-} insegna però ad essere cauti: difetti di differenziamento possono non essere evidenti da analisi istologiche oppure possono manifestarsi solo in alcune condizioni fisiologiche o patologiche. Inoltre ancora non è stato indagato il ruolo degli altri due componenti della famiglia di pRb nel differenziamento dell'epitelio della ghiandola mammaria e della prostata.

Anche gli altri componenti della famiglia di pRb hanno voce nel processo differenziativo, anche se solo in alcuni tipi cellulari. Quanto affermato non sembrerebbe giustificato dal fenotipo dei topi p107^{-/-} e p130^{-/-}, che sono normali e fertili. Al contrario il fenotipo dei topi p107^{-/-}:p130^{-/-} indica che queste due proteine non sono superflue ma che, possono sostituirsi funzionalmente l'un l'altra. I topi p107^{-/-}:p130^{-/-}, infatti, pur nascendo nel numero atteso, muoiono poco dopo, con gravi difetti nello sviluppo degli arti. La causa risiede in un incompleto differenziamento dei condrociti che non raggiungono lo stato post-mitotico. Questi topi mostrano anche difetti nel differenziamento dei cheratinociti e un ritardo nella morfogenesi dei denti e dei follicoli piliferi (Cobrinik et al., 1996). Se questi difetti siano attribuibili ad una compromissione dei meccanismi di uscita dal ciclo cellulare o del programma differenziativo è ancora da stabilire.

I fenotipi dei topi Rb^{-/-}:p107^{-/-} e dei topi Rb^{-/-}:p130^{-/-} indicano che p107/p130 possono, almeno parzialmente, sopperire all'assenza di pRb. Gli embrioni hanno un fenotipo simile a quello dei topi privi di pRb, ma muoiono due giorni prima (E11-13) e mostrano apoptosi accelerata nel fegato e nel sistema nervoso (Lipinski and Jacks, 1999).

LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA NELLA REGOLAZIONE DELL'APOPTOSI

Un altro aspetto del differenziamento terminale è sotto il controllo di pRb: l'acquisizione da parte dei tessuti differenziati della resistenza all'apoptosi. La modulazione dell'attività di E2F da parte di pRb è anche implicata nell'acquisizione da parte dei tessuti differenziati di una maggiore resistenza alla morte cellulare programmata. Questo aspetto del differenziamento è stato particolarmente studiato nei sistemi terminalmente differenziati muscolare e neuronale. In questi tessuti le cellule precursore sono particolarmente sensibili alla morte per apoptosi durante il processo differenziativo (Walsh, 1997). Tuttavia come escono dal ciclo cellulare ed iniziano ad esprimere i marcatori tessuto specifici, queste cellule diventano notevolmente resistenti agli stimoli apoptotici. Questa resistenza correla con l'espressione dell'inibitore delle chinasi p21, e con la diminuzione della fosforilazione di pRb. E' inoltre dipendente dalla presenza di pRb funzionale. Infatti cellule muscolari e neuronali Rb^{-/-} mostrano un marcato incremento della mortalità al momento dell'induzione del differenziamento e diventano ipersensibili agli stimoli apoptotici (Wang et al., 1997).

E2F-1 è l'unico della famiglia di fattori trascrizionali E2F ad essere in grado di indurre apoptosi. E' quindi possibile che la protezione dall'apoptosi promossa da pRb dipenda dalla sua capacità di legare ed inattivare E2F-1. Infatti, gli embrioni Rb^{-/-} e E2F-1^{-/-}, mostrano una significativa diminuzione della mortalità per apoptosi sia nel sistema nervoso centrale che nel cristallino (Lipinski and Jacks, 1999).

L'apoptosi nel sistema nervoso centrale e nel cristallino è inoltre p53-dipendente (Morgenbesser et al 1994). E' stato infatti dimostrato che E2F-1 può contribuire alla regolazione di p53 inducendo p19^{ARF} e inattivando MDM2 (Zhang et al, 1998). Questo meccanismo potrebbe spiegare la forte incidenza dell'apoptosi nei tessuti, in assenza di pRb. In accordo con questa ipotesi, embrioni mancanti sia di p19^{ARF} che di pRb mostrano ridotti livelli di morte cellulare nel cristallino, rispetto agli embrioni Rb^{-/-}. Ciò dimostra che la morte cellulare indotta nei tessuti dall'assenza di pRb è almeno parzialmente p19^{ARF}-indipendente (Pomerantz et al., 1998)

CAPITOLO 4. LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA NEL DIFFERENZIAMENTO DEL MUSCOLO SCHELETRICO

IL MUSCOLO SCHELETRICO: UN MODELLO DI DIFFERENZIAMENTO TERMINALE

Il muscolo scheletrico costituisce uno dei modelli di differenziamento terminale maggiormente caratterizzati sia *in vivo* che *in vitro*.

Durante l'embriogenesi segnali multipli extracellulari sia inibitori che stimolatori, inducono precursori mesodermici pluripotenti del mesoderma parassiale a divenire precursori delle cellule muscolari scheletriche (mioblasti). In risposta a specifici segnali provenienti dal microambiente extracellulare, i mioblasti proliferano e migrano dai somiti verso i diversi distretti corporei dove fondono a formare miotubi polinucleati post-mitotici e infine si organizzano in fibre muscolari (Walsh and Perlman, 1997).

Mioblasti proliferanti ed indifferenziati possono essere propagati *in vitro* in presenza di siero. I fattori di crescita presenti nel terreno promuovono la proliferazione dei mioblasti e ne prevengono il differenziamento. Quando i mioblasti sono deprivati dei fattori di crescita, escono definitivamente dal ciclo cellulare ed iniziano ad esprimere geni muscolo-specifici (differenziamento biochimico). A questo stadio sono chiamati *miociti*, e, pur essendo ancora mononucleati, sono terminalmente differenziati (TD), in quanto non possono essere indotti nuovamente a dividersi mediante stimolazione con fattori di crescita. I miociti mostrano anche una ridotta predisposizione all'apoptosi. Successivamente i miociti fondono a formare grandi sincizi multinucleati chiamati *miotubi* (differenziamento cellulare). Tipicamente il differenziamento è completo in pochi giorni (Walsh and Perlman, 1997).

Dal punto di vista molecolare, il processo differenziativo muscolare consiste di una serie ordinata di eventi molecolari la cui realizzazione è fondamentale sia per il raggiungimento dello stato postmitotico, sia per l'espressione dei geni muscolo-specifici.

L'espressione genica muscolo-specifica è attivata dall'azione coordinata di due famiglie di fattori trascrizionali miogenici: la famiglia bHLH (basic helix-loop-helix), comprendente MyoD, Myf5, miogenina e MRF4, e la famiglia MEF-2 (myocyte enhancer factor 2). Nel topo l'inattivazione

genica di ognuno dei quattro membri della famiglia di fattori trascrizionali bHLH ha dimostrato che svolgono un ruolo centrale nella miogenesi (Arnold and Winter, 1998). Due componenti di questa famiglia di proteine, MyoD e Myf5, sono già presenti nei mioblasti proliferanti e indifferenziati; il loro ruolo consiste nell'indirizzare il differenziamento dei precursori proliferanti esclusivamente nella direzione miogenica. I passaggi successivi della miogenesi richiedono un altro fattore bHLH, miogenina. Quest'ultima coopera con i componenti della famiglia MEF2, all'attivazione dell'espressione di molti geni strutturali del muscolo scheletrico. Studi condotti sul differenziamento *in vitro* dei mioblasti hanno rivelato che l'espressione della miogenina viene indotta 24 h dopo la rimozione del siero (Andrés and Walsh, 1996). Successivamente queste cellule esprimono l'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti (Cdk) p21 ed escono permanentemente dal ciclo cellulare (Halevy et al., 1995). Una volta che le cellule sono divenute postmitotiche, circa 36-48 h dopo la rimozione dei fattori di crescita, viene indotta l'espressione di proteine miofibrillari, come la catena pesante della miosina (MyHC), la catena leggera della miosina (MLC) e la creatina chinasi muscolare (MCK). I miociti post-mitotici completano il loro differenziamento fondendo in miotubi multinucleati (Lassar et al., 1994).

E' da tempo noto che il prerequisito fondamentale perché venga indotta l'espressione dei geni-muscolo specifici è l'uscita definitiva dal ciclo cellulare. Infatti, fatta eccezione per miogenina, la trascrizione dei geni specifici dello stato differenziato si verifica esclusivamente in cellule postmitotiche. Entrambi questi aspetti sono regolati da pRb, che controlla il differenziamento muscolare sia arrestando le cellule in G₀, sia cooperando con MyoD nello stimolare l'attività trascrizionale della famiglia di fattori miogenici MEF2 (Schneider et al., 1994; Novitch et al., 1996; Novitch et al., 1999).

LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA CONTROLLA LE FASI FINALI DEL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

La prima evidenza che pRb fosse coinvolta nel differenziamento del muscolo scheletrico risale ai primi anni novanta, quando erano già stati scoperti e clonati MyoD e gli altri componenti della famiglia bHLH. Durante le fasi iniziali di caratterizzazione di MyoD, era stato dimostrato che esprimendolo ectopicamente era possibile convertire fibroblasti

embrionali murini (MEF) in cellule muscolari scheletriche in grado di raggiungere un differenziamento terminale completo (Davis et al., 1987). Successivamente fu dimostrato che MyoD era in grado di indurre arresto proliferativo in cellule normali e trasformate, indipendentemente dalle sue proprietà differenziative (Crescenzi et al., 1990). Il significato fisiologico dell'arresto proliferativo indotto da MyoD è tuttora poco chiaro, ma la scoperta indusse a identificare i meccanismi molecolari che erano alla base di questo effetto. Nel 1993 fu scoperto che MyoD, per indurre l'arresto definitivo del ciclo cellulare e il raggiungimento dello stato postmitotico nelle cellule muscolari, richiedeva obbligatoriamente della cooperazione di pRb (Gu et al., 1993). Nello stesso lavoro fu dimostrata anche l'interazione *in vitro* e *in vivo* di pRb e MyoD. Questa interazione non fu mai ulteriormente confermata, ma la cooperazione tra MyoD e pRb fu successivamente documentata e rafforzata.

Nel 1994 fu finalmente dimostrato che in assenza di pRb il muscolo scheletrico raggiunge un incompleto differenziamento terminale (Schneider et al., 1994). In questo lavoro fu evidenziato che linee di mioblasti provenienti da topi $Rb^{-/-}$ differenziavano apparentemente in maniera normale, ma che i miotubi da essi derivati, a differenza dei *wild-type*, se stimolati con fattori di crescita, sintetizzavano DNA.

Lassar e collaboratori dimostrarono nello stesso anno che MyoD, incrementando l'espressione dell'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, p21, induceva arresto proliferativo nelle cellule in cui era ectopicamente espresso, e nei miociti durante il differenziamento (Havely et al., 1995).

Successivamente fu scoperto che l'espressione ectopica di p16, un inibitore dei complessi chinasi ciclina D1/cdk4 e cdk6, e di p21 attivavano le funzioni di MyoD in mioblasti stimolati con fattori di crescita (Skapek et al., 1995). Era già da tempo noto che le cicline di tipo D in associazione con le chinasi Cdk4-6 fosforilavano ed inattivavano pRb (Weinberg, 1995). Ulteriori studi dimostrarono che durante il differenziamento miogenico il livello di espressione di pRb aumentava (Martelli et al., 1994) e che pRb assumeva una forma ipofosforilata, attiva (Gu et al., 1993). Inoltre fu evidenziato che nei miotubi terminalmente differenziati, pRb e p130 si trovavano associati in complessi di legame al DNA contenenti i fattori trascrizionali E2F. Questa evidenza suggerì che durante il differenziamento muscolare pRb e p130 potessero regolare l'uscita definitiva dal ciclo cellulare inibendo l'attività trascrizionale dei fattori E2F (Corbeil et al., 1995; Havely et al., 1995; Shin et al., 1995).

Nel 1996 fu pubblicato un lavoro in cui il ruolo di pRb nel

differenziamento del muscolo scheletrico fu ulteriormente approfondito (Novitch et al., 1996).

In questo lavoro fu dimostrato che MyoD, ectopicamente espressa in MEF Rb^{-/-}, induceva un differenziamento aberrante, caratterizzato dalla normale espressione di marcatori differenziativi precoci, come miogenina e p21, ma una ridotta espressione di proteine muscolo-specifiche tardive, come MHC. Difetti simili non erano evidenziabili nelle cellule p107^{-/-} e p130^{-/-}, indicando che l'assenza di espressione dei marcatori muscolari tardivi dipendeva specificamente dall'assenza di pRb. Inoltre a differenza dei miociti p107^{-/-} e p130^{-/-} che raggiungevano lo stato postmitotico, i miociti Rb^{-/-} si accumulavano nelle fasi S e G₂ del ciclo cellulare ed esprimevano elevati livelli delle cicline A e B, delle chinasi ciclina-dipendenti Cdk2 e Cdc2. Per di più i miociti Rb^{-/-} si dimostrarono incapaci di procedere in mitosi ed avevano, in confronto ai miociti p107^{-/-} e p130^{-/-}, una ridotta tendenza a fondere in miotubi multinucleati (Novitch et al., 1996).

In conclusione questi risultati dimostrarono che pRb, ma non p107 e p130, era necessaria nel processo differenziativo del muscolo scheletrico, essendo essenziale per il raggiungimento dello stato postmitotico e per l'espressione delle proteine muscolari tardive.

Tre anni dopo lo stesso gruppo di ricerca dimostrò che il motivo della ridotta espressione delle proteine muscolo-specifiche nei miotubi Rb^{-/-} risiedeva nell'incapacità di MyoD di attivare MEF2C, un componente della famiglia di fattori trascrizionali MEF2. In assenza di pRb, MyoD induceva normali livelli di espressione di questa proteina, che mostrava una corretta localizzazione nucleare e la capacità di legare il DNA, ma era trascrizionalmente inattiva. L'attivazione delle funzioni trascrizionali di MEF2C richiedeva la contemporanea presenza di pRb e MyoD e correlava con l'induzione del dominio di transattivazione di MEF2C (MEF2C TAD) (Novitch et al., 1999).

In conclusione i mioblasti indotti a differenziare terminalmente in assenza di pRb procedono normalmente nelle fasi iniziali del programma differenziativo, in quanto richiedono solo di MyoD per esprimere miogenina e MEF2C. pRb è richiesta nelle fasi finali del programma differenziativo, per promuovere l'uscita definitiva dal ciclo cellulare e l'espressione delle proteine muscolari (Fig. 2).

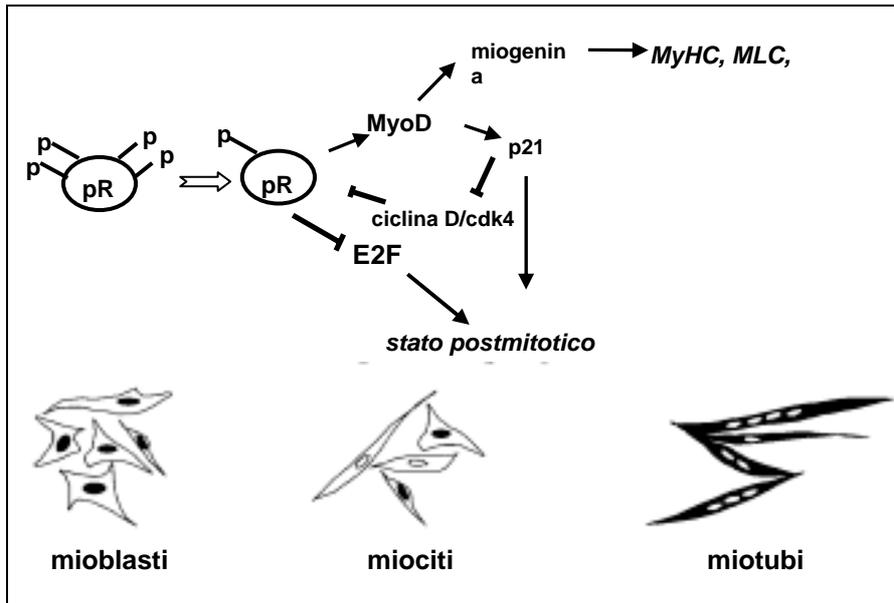


Figura 2. *pRb* controlla l'ingresso nelle fasi finali del programma differenziativo muscolare, promuovendo sia l'uscita definitiva dal ciclo cellulare sia l'espressione delle proteine muscolari (Novitch et al., 1999)

CAPITOLO 5. RIATTIVAZIONE DEL CICLO CELLULARE NEI MIOTUBI TERMINALMENTE DIFFERENZIATI

I MIOTUBI RISPONDONO ALLA STIMOLAZIONE CON SIERO

Il fatto che i miotubi, essendo cellule terminalmente differenziate, non sintetizzano DNA in risposta ai fattori di crescita, non necessariamente implica che siano assolutamente refrattari a stimoli proliferativi. Per capire se, e a quale livello, le cellule muscolari scheletriche fossero resistenti ai mitogeni, miotubi TD sono stati trasfettati con oncogeni retrovirali e/o con geni regolatori del ciclo cellulare, da soli o in combinazione (Tabella 1). Nessuno dei geni trasfettati ha indotto sintesi di DNA nei miotubi TD. Sorprendentemente i miotubi TD si dimostrarono invece sensibili alla stimolazione con siero, essendo in grado di uscire dalla fase G₀ e progredire fino ad un punto della fase G₁, che approssimativamente coincide con l'espressione della ciclina D1 (Tiainen et al., 1996a). La risposta precoce dei miotubi al siero era praticamente indistinguibile da quella di mioblasti resi quiescenti e successivamente restimolati. Analogamente a questi ultimi, esprimevano, infatti, c-fos, c-jun, c-myc, Id-1 e la ciclina D1. A differenza dei mioblasti quiescenti, che in risposta al siero esprimono i geni della tarda G₁, come ciclina E, B-myb e ciclina A, i miotubi non oltrepassavano la fase di espressione della ciclina D₁ (Tiainen et al., 1996a). Questi risultati sono importanti per diversi motivi. In primo luogo dimostrano che i miotubi sono in grado di rispondere ai fattori di crescita e di trasdurre i segnali mitogenici al nucleo. Inoltre smentiscono l'idea che i miotubi non proliferino a causa della loro incapacità di uscire dalla fase G₀. Infine, suggeriscono l'esistenza di un blocco nella media fase G₁, che impedisce l'ulteriore progressione nella fase S del ciclo cellulare (Fig. 3).

L'ONCOGENE ADENOVIRALE E1A RIATTIVA IL CICLO CELLULARE NEI MIOTUBI TERMINALMENTE DIFFERENZIATI

Successivamente fu dimostrato che l'oncogene adenovirale E1A, così come altri oncogeni di virus a DNA, era in grado di indurre sintesi di DNA nei miotubi TD (Crescenzi et al., 1995a; Crescenzi et al., 1995b; Tiainen et

al., 1996b). Era già noto che mioblasti infettati con poliomavirus e SV40 e successivamente indotti a differenziare, rientravano in ciclo sintetizzando DNA (Yaffe et al., 1967; Fogel et al., 1967). Tuttavia poiché entrambi i virus infettano solo le cellule proliferanti, le infezioni furono effettuate in mioblasti. Ciò lasciava aperta la possibilità che gli antigeni T inducessero sintesi nei miotubi solo se espressi prima del differenziamento, e non dopo. Per poter esprimere E1A direttamente nei miotubi TD, fu utilizzato come veicolo di espressione lo stesso adenovirus che infetta le cellule indipendentemente dal loro stato proliferativo. Inoltre venne utilizzato il mutante adenovirale dl520, che esprimendo il trascritto 13S del gene E1A, ma non il 12S, risultava meno tossico per le cellule. Questo mutante, nelle ottimali condizioni sperimentali, è in grado di indurre sintesi di DNA nel 100% dei miotubi infettati, e di portare una sostanziale porzione di questi fino ed oltre la mitosi (Crescenzi et al., 1995b). Frequentemente si osservava che la maggior parte dei miotubi riattivati con E1A procedevano attraverso il primo ciclo e morivano per apoptosi durante il secondo (Latella et al., 2000). La morte cellulare poteva essere ritardata coesprimendo insieme ad E1A il gene antiapoptotico adenovirale E1B (Latella et al., 2000).

I miotubi sottoposti ad infezione con dl520 furono analizzati dal punto di vista molecolare e il quadro che ne risultò era virtualmente opposto a quello ottenuto stimolando i miotubi con il siero. I geni della fase G1 precoce, come c-fos, c-jun, c-myc e Id-1 erano rapidamente silenziati man mano che E1A si accumulava nei miotubi. Al contrario, l'espressione dei geni tardivi della fase G1, che non venivano indotti dal siero, come ciclina E, PCNA, B-myb e ciclina A, era rapidamente indotta da E1A. Questo portò alla conclusione che E1A non forzava il blocco della media fase G1 precedentemente descritto, ma lo oltrepassava direttamente, agendo in corrispondenza della transizione G1-S (fig. 3) (Tiainen et al., 1996b).

Non tutti gli oncogeni di virus a DNA sono in grado di indurre i miotubi TD a sintetizzare DNA. E' questo il caso dell'oncogene E7, responsabile delle principali proprietà immortalizzanti e trasformanti del papillomavirus umano (McMurray et al., 2001) e molto somigliante strutturalmente e funzionalmente agli antigeni T e ad E1A (Munger et al., 2001). Nonostante queste sue caratteristiche, e il fatto che legghi e riduca l'espressione di pRb, è stato recentemente dimostrato che E7 non riattiva la fase S nei miotubi TD (Sacco et al., 2003). La causa della permanenza dei miotubi nello stato postmitotico era da attribuirsi all'assenza di attività chinasi associata alla ciclina E, nonostante gli elevati livelli di espressione di quest'ultima. Il

ripristino di tale attività mediante espressione ectopica di ciclina E e cdk2 forzava i miotubi esprimenti E7 a sintetizzare DNA. E' interessante il fatto che se espresso in mioblasti, E7 impediva l'uscita definitiva dal ciclo cellulare, indicando che questo oncogene inibiva l'ingresso nello stato postmitotico, ma non il suo mantenimento (Sacco et al., 2003). Ciò suggerisce che i meccanismi che controllano questi due eventi sono almeno parzialmente distinti.

UNA SECONDA BARRIERA

Tra le numerose proteine cellulari con cui E1A interagisce, vi sono pRb (Egan et al., 1989), p107 (Ewen et al., 1991) e p130 (Li et al., 1993). Era ipotizzabile quindi che E1A, rimuovendo pRb e presumibilmente anche gli altri componenti della famiglia, dai complessi con i fattori E2F, promuovesse il rilascio di questi ultimi dal loro controllo (Weinberg, 1995), e consentisse quindi l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi del DNA. In accordo con questa visione, l'espressione ectopica dei fattori E2F, corrisponderebbe al loro rilascio dal controllo imposto dalla famiglia di pRb, e dovrebbe guidare le cellule nella fase S. Questo modello è stato confermato dall'abilità di E2F-1 di indurre sintesi di DNA in fibroblasti in varie circostanze (Dyson, 1998). Anche nei miocardiociti TD E2F-1 era in grado di rimpiazzare E1A inducendo l'ingresso in fase S e riducendo l'espressione di fattori tessuto-specifici. Tuttavia, come mostrato in tabella 1, e come dimostrato da un altro gruppo, la trasfezione di E2F-1, E2F-2 e E2f-4 nei miotubi TD non induceva nuovamente sintesi di DNA nei miotubi TD (Puri et al., 1998; Pajalunga et al., 1999). Il mancato reingresso in fase S non era dovuto all'assenza dell'attività trascrizionale dei fattori E2F ectopicamente espressi nei miotubi, quindi E1A doveva esercitare altre funzioni, oltre quella di liberare i fattori E2F da pRb. E' importante sottolineare che il meccanismo con cui E1A riattiva la sintesi di DNA nei miotubi è piuttosto complicato da analizzare, in quanto E1A, oltre ad interagire con pRb (Egan et al., 1989) e gli altri componenti della famiglia (Ewen et al., 1991; Li et al., 1993), lega altre proteine cellulari, come l'inibitore delle chinasi p21 (Mal et al, 2000), l'acetilasi p300 (Eckner et al., 1994), la ciclina A (Pines et al., 1990), e la chinasi ciclina-dipendente, cdk2 (Tsai et al, 1991).

Un'altra possibilità di forzare i miotubi TD ad attraversare la transizione G1/S era quella di ricostituire l'attività chinastica del complesso

ciclinaE/cdk2. Questa chinasi è in grado di promuovere il passaggio nella fase S del ciclo anche in assenza di attività associata ad E2F, utilizzando una via alternativa al meccanismo di regolazione mediato da pRb ed E2F (Lukas et al., 1997). Tuttavia l'attivazione della chinasi endogena ciclina E/cdk2, utilizzando un mutante di E1A, non portava i miotubi TD a sintetizzare DNA (Mal et al., 2000). Inoltre l'espressione ectopica di ciclina E e cdk2 nei miotubi, nonostante gli elevati livelli di attività chinasica del complesso derivante, e la conseguente fosforilazione ed in attivazione funzionale di pRb, non comportava replicazione del DNA (Latella et al., 2001).

Questi risultati nel loro insieme indicano che il controllo dell'ingresso in fase S nei miotubi è differente rispetto a quello delle cellule non terminalmente differenziate e solleva il problema di un secondo blocco al livello della transizione G1/S (Fig. 3).

RIATTIVAZIONE DEI MIOTUBI MEDIANTE ESPRESSIONE DI GENI CELLULARI

Da almeno due punti di vista l'uso di oncogeni per la riattivazione del ciclo cellulare in cellule terminalmente differenziate è insoddisfacente. In primo luogo E1A, come altri oncogeni virali stabilisce interazione con molte proteine cellulari, il che rende complicato la caratterizzazione dei meccanismi che sono alla base del mantenimento dello stato postmitotico. Inoltre E1A, agendo a valle del primo blocco, nella media G1 (Fig. 3), fornisce poche informazioni riguardo alla natura di tale blocco.

Un'evidenza importante deriva dagli esperimenti condotti sui miotubi stimolati con siero: l'ultimo evento rilevabile, attivato dal siero, è l'induzione dell'espressione di ciclina D1. Poiché è noto che l'attività chinasica associata alla ciclina D1 è indispensabile per la normale progressione del ciclo cellulare in cellule normali (Baldin et al., 1993), si è tentato di comprendere se proprio la mancanza di tale attività fosse responsabile dell'assenza di progressione dei miotubi oltre la fase G1 del ciclo cellulare. Esperimenti iniziali hanno confermato che cdk4, una delle chinasi che forma complessi con la ciclina D1, era costitutivamente espressa nei miotubi TD. Inoltre, in seguito al trattamento con siero, la ciclina D1 si accumulava nei miotubi a livelli comparabili a quelli riscontrati nei mioblasti proliferanti. Tuttavia, esperimenti di immunoprecipitazione dimostrarono la totale assenza di attività chinasica

associata ai complessi ciclina D1/cdk4. Entrambe queste proteine vennero quindi ectopicamente espresse nei miotubi utilizzando degli adenovirus ricombinanti. Espresi separatamente, i due fattori non inducevano alcun reingresso in fase S dei miotubi infettati. Al contrario, se coespresi a livelli molto elevati e in presenza di siero, erano in grado di riattivare l'85% dei miotubi infettati. La massima riattivazione dei miotubi si otteneva esprimendo entrambe le proteine a livelli tali da ottenere una attività chinasi comparabile a quella riscontrata nei mioblasti proliferanti. Anche adipociti 3T3-L1 e, a livelli inferiori, neuroni derivati dalla linea P19 erano ugualmente riattivabili mediante coespressione di ciclina D1 e cdk4 (Latella et al., 2001).

La richiesta di espressione ectopica della chinasi cdk4, oltre che di ciclina D1, per l'induzione della sintesi di DNA nei miotubi TD, era probabilmente necessaria per la titolazione degli inibitori delle chinasi appartenenti alle famiglie INK4 e Cip/Kip. Questi ultimi, che comprendono p21, p27 e p57, sono, infatti, espressi ad elevati livelli nei miotubi ed è stato ipotizzato un loro ruolo nel mantenimento dello stato postmitotico. L'inibitore di tipo Cip/Kip, p21, è non a caso indotto da pRb e MyoD e nelle prime fasi del differenziamento muscolare ed è ritenuto responsabile dell'uscita definitiva dal ciclo cellulare (Havely et al., 1995).

L'ipotesi che i complessi ciclina D1/cdk4 ectopicamente espressi titolassero gli inibitori del ciclo cellulare, era confortata dal fatto che i miotubi potevano essere riattivati con efficienza simile, mediante la forzata espressione di ciclina D1 insieme ad un dominante negativo di cdk4, privo di attività chinasi. Questa evidenza può essere spiegata considerando che il dominante negativo, così come il *wild-type*, agiscono scansando gli inibitori dai complessi chinasi costituiti da ciclina D1 e cdk4 esogeni e/o endogeni (Latella et al., 2001).

Questi risultati indicavano che il principale ostacolo che impediva ai miotubi e, probabilmente ad altri tipi cellulari, l'ingresso in fase S, risiedeva nella loro incapacità di indurre l'attività chinasi associata alla ciclina D1. È importante notare che i miotubi riattivati ristabilendo l'attività chinasi associata alla ciclina D1, ignoravano il blocco precedentemente descritto in corrispondenza della transizione G1/S (Fig. 3).

ESISTE UNA TERZA BARRIERA?

I mitotubi riattivati con ciclina D1/cdk4, raramente raggiungono la mitosi. L'analisi citofluorimetrica di miociti TD esprimenti ciclina D1 e cdk4 esogeni ha mostrato che si accumulano indefinitamente nella fase G₂ (Latella et al., 2001). Questa evidenza solleva la possibilità che esista una terza barriera che impedisce ai mitotubi di dividersi dopo la replicazione del DNA. Possono essere formulate diverse ipotesi sulla causa di questo arresto, che non è stato osservato nei mitotubi riattivati con E1A (Crescenzi et al., 1995b; Latella et al., 2000). Una possibilità è che l'arresto prima della mitosi costituisca un mezzo per impedire una catastrofica divisione dei mitotubi e che il sistema più "fisiologico" di riattivazione dei mitotubi TD, ottenuto con la ricostituzione dell'attività chinasi associata alla ciclina D1, metta in risalto un ulteriore blocco alla progressione nel ciclo cellulare, nascosto, in quanto superato, da E1A. Esistono altri esempi di arresto in G₂ di cellule TD. Per esempio i miocardiociti, anche quando riattivati con E1A, si accumulano in G₂ (Liu et al., 1996). Inoltre l'invasione delle fibre muscolari da parte del parassita *Trichinella spiralis* induce reingresso in fase S dei mitotubi. Anche in questa circostanza naturale le fibre muscolari non raggiungono la mitosi (Jasmer, 1993). Infine anche mioblasti provenienti da topi Rb^{-/-} si accumulano in G₂ e, sebbene queste cellule non raggiungano lo stato postmitotico, raramente si dividono (Schneider et al., 1994; Novitch et al., 1996). Questi esempi potrebbero suggerire l'effettiva esistenza, almeno in alcuni tipi di cellule TD, di una barriera che le preservi da una divisione cellulare potenzialmente distruttiva. Alternativamente, queste osservazioni sono compatibili con l'attivazione del *checkpoint* della G₂ conseguente al danno al DNA dovuto al forzato rientro nel ciclo cellulare. L'arresto del ciclo causato dall'attivazione del *checkpoint* della G₂ è parzialmente mediato da p21 (Bunz et al., 1998), che è spesso espresso ad elevati livelli nei mitotubi riattivati (Tiainen et al., 1996b; Latella et al., 2001). Nel caso specifico dell'ingresso nel ciclo cellulare indotto nei mitotubi da ciclina D1/cdk4, l'espressione deregolata di cdk4 potrebbe alterare il controllo delle fasi finali del ciclo cellulare. E' evidente che saranno necessari ulteriori esperimenti per determinare l'effettiva natura del blocco in G₂. D'altra parte non in tutti i tipi cellulari TD il reingresso in ciclo mediato da ciclina D1/cdk4 si interrompe prima della mitosi. Almeno gli adipociti frequentemente entrano in mitosi in seguito all'espressione ectopica di queste proteine (Latella et al., 2001), dimostrando l'esistenza di differenze

tra cellule TD diverse.

E' importante riportare che in un lavoro di pochi anni fa è stato dimostrato che il gene omeotico murino *msx1* può indurre la segmentazione di miotubi TD derivati da mioblasti C2C12, e che le cellule mononucleate da essi derivati possono proliferare indefinitamente (Odelberg et al., 2000). Inoltre le cellule risultanti dalla frammentazione dei miotubi sembrano de-differenziare ad uno stadio compatibile con il re-differenziamento in diversi tipi cellulari, incluse le stesse cellule muscolari. Questa è probabilmente la prima evidenza che un gene regolatore dello sviluppo possa agire in cellule "adulte" con una modalità simile a quella svolta durante lo sviluppo stesso. Inoltre per la prima volta, cellule TD sono state indotte a proliferare senza incorrere nell'apoptosi. Se confermato, questo lavoro potrebbe costituire un notevole passo avanti nelle nostre conoscenze sul differenziamento terminale.

SOPPRESSIONE DELL'ESPRESSIONE DEI GENI MUSCOLO-SPECIFICI

La riattivazione dei miotubi, sia essa indotta da E1A che da ciclina D1/*cdk4*, comporta una riduzione dell'espressione dei geni muscolo specifici (Tiainen et al., 1996b; Latella et al., 2001). Poiché la proliferazione e il differenziamento sono generalmente incompatibili, si può desumere che il forzato reingresso in ciclo dei miotubi TD preveda inevitabilmente la perdita della completa espressione dei marcatori tessuto-specifici. Questo è certamente in parte vero, visto che in base a quanto finora noto in letteratura, il reingresso in ciclo dei miotubi TD, coincide sempre con l'inattivazione mediante fosforilazione di pRb, mentre è la sua forma attiva, ipofosforilata che partecipa all'espressione dei geni muscolo specifici (Gu et al., 1993). Esiste però un'eccezione: mioblasti esprimenti E7 non raggiungono lo stato postmitotico e continuano a sintetizzare DNA, in un contesto di espressione dei marcatori muscolari solo parzialmente alterato (Sacco et al., 2003). D'altra parte tutti i geni che si sono dimostrati in grado di indurre reingresso forzato dei miotubi in ciclo (E1A, ciclinaD1, *cdk4*), quando espressi in mioblasti, interferiscono nel differenziamento indipendentemente dalla loro attività nel ciclo cellulare (Tiainen et al., 1996b; Webster et al., 1988; Skapek et al., 1995; Zhang et al., 1999). Quindi se la soppressione del differenziamento sia una conseguenza del reingresso forzato in ciclo o se è una conseguenza accidentale del sistema utilizzato per indurlo, rimane da stabilire.

TABELLA 1. Geni la cui espressione non riattiva il ciclo cellulare in miotubi murini.

<i>Gene</i>	<i>Funzione</i>	<i>Referenza</i>
erb-2	Recettore della tirosina chinasi	Tiainen et al., 1996a
Ha-ras	proteina di legame al GDP	"
V-myc	oncogene nucleare retrovirale	"
B-myb	proto-oncogene nucleare	"
E2F-1	fattore di trascrizione	"
		Pajalunga et al., 1999
E2f-2	fattore di trascrizione	Pajalunga et al., 1999
E2f-4	fattore di trascrizione	Pajalunga et al., 1999
ciclina E	ciclina	Latella et al., 2001
ciclina A	ciclina	dato non pubblicato
Id-1	regolatore del ciclo cellulare, contenente un motivo HLH	Tiainen et al., 1996a
<i>Combinazione di geni</i>		
v-myc+Ha-ras		Tiainen et al., 1996
v-myc+B-myb		Tiainen et al., 1996
v-myc+Id-1		Tiainen et al., 1996
Ha-ras+Id-1		Tiainen et al., 1996
erbB-2+E2F-1		Tiainen et al., 1996
cicl. E+cdk2		Latella et al., 2001

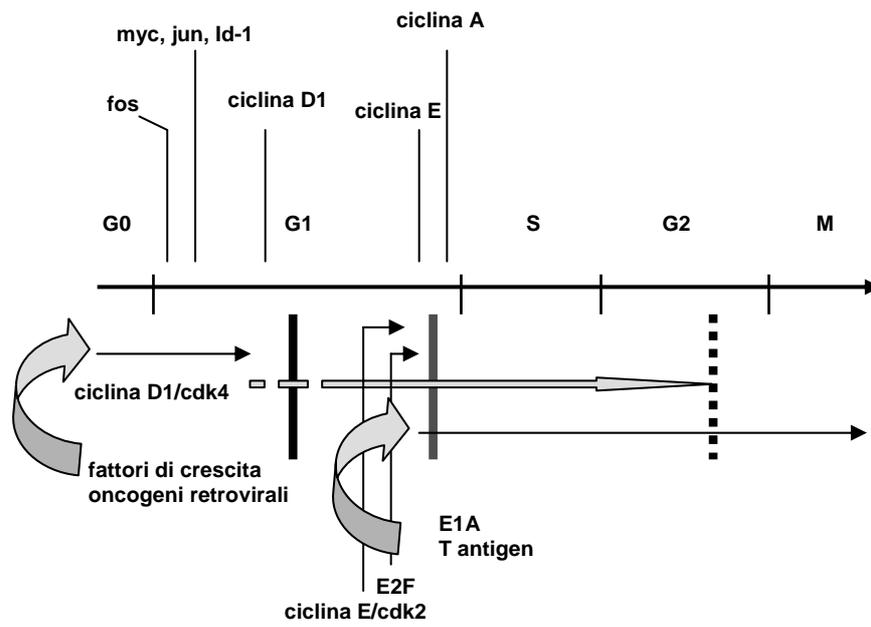


Figura 3. Rappresentazione schematica del ciclo cellulare nei mitosi. Il terzo, possibile blocco in G2 è rappresentato da una linea interrotta.

OBIETTIVI DI RICERCA

L'arresto definitivo della proliferazione, condizione nota come stato postmitotico, costituisce la caratteristica principale dello stato terminalmente differenziato e il prerequisito fondamentale per la successiva espressione dei marcatori tessuto specifici. E' da tempo noto che pRb, è assolutamente richiesto, sia *in vivo* che *in vitro*, per il raggiungimento dello stato postmitotico di molti tipi cellulari, tra cui le cellule muscolari scheletriche (Lipinski and Jacks, 1999). Mioblasti Rb^{-/-} raggiungono un incompleto differenziamento terminale, convertendo in miotubi che continuano a sintetizzare DNA (Schneider et al., 1994; Novitch et al., 1996; Zacksenhaus et al., 1996)

E' opinione generale che, poiché pRb è essenziale per il raggiungimento dello stato post-mitotico, lo sia anche per il suo mantenimento (Lipinski and Jacks, 1999; Lowenheim et al., 1999; Mal et al., 2000; Novitch et al., 1996; Ruiz et al., 2004). Questa assunzione non è mai stata verificata direttamente, ma varie evidenze la rendono ragionevole. In primo luogo, pRb è altamente espressa nei miotubi terminalmente differenziati (Coppola et al., 1990), e vi si trova nello stato ipofosforilato, localizzata nel nucleo (Gu et al., 1993) associata ai fattori trascrizionali E2F (Corbeil et al., 1995; Havely et al., 1995; Shin et al., 1995). Inoltre oncoproteine virali come E1A, notoriamente in grado di interagire e inattivare varie proteine cellulari, tra cui pRb, p107 e p130, riattivano il ciclo cellulare in miotubi terminalmente differenziati (Crescenzi et al., 1995b). Infine, in un recente lavoro è stato dimostrato che MEF quiescenti e senescenti possono essere reindotte a proliferare semplicemente rimuovendo pRb (Sage et al., 2003). Esistono d'altra parte numerose altre evidenze che indicano che pRb non è coinvolta nel mantenimento dell'uscita definitiva dal ciclo cellulare. In esperimenti non pubblicati, l'espressione nei miotubi TD di varie molecole note legare e inattivare pRb, come Id2, MDM2, e le proteine IE1 e IE2 di citomegalovirus, non induce sintesi di DNA. Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione forzata dei fattori trascrizionali E2F, o della chinasi cdk2, in grado di fosforilare ed inattivare pRb, non sono in grado di indurre la fase S in miotubi TD (Latella et al., 2001; Pajalunga et al., 1999; Puri et al., 1998). Infine l'oncoproteina E7 di papillomavirus è altrettanto incapace di promuovere sintesi di DNA nelle cellule muscolari differenziate, pur promuovendo la degradazione di pRb (Sacco et al., 2003). Queste evidenze indicano fortemente che pRb non è responsabile del mantenimento dello

stato postmitotico e che altri meccanismi, possibilmente innescati da pRb al momento dell'induzione dell'uscita dal ciclo cellulare, siano responsabili dell'arresto definitivo della proliferazione nei miotubi.

Le evidenze presenti in letteratura, siano esse favorevoli o contrarie al coinvolgimento di pRb nel mantenimento dello stato postmitotico, sono indirette, perché mai prima d'ora sono stati condotti esperimenti di deplezione di pRb in miotubi postmitotici. Per verificare l'ipotesi che pRb non fosse essenziale per il mantenimento dello stato postmitotico, ci siamo quindi avvalsi di un sistema murino *knockout* condizionale RbLoxP (Marino et al., 2000). In questi topi alle estremità dell'esone 19 del gene Rb sono inseriti due siti di riconoscimento per la ricombinasi Cre, (siti loxP). Miotubi RbLoxP sono stati quindi indotti a differenziare terminalmente in presenza di pRb e, i miotubi TD risultanti sottoposti alla delezione di Rb con la ricombinasi Cre. Nonostante la completa scomparsa di pRb, non è mai stata osservata incorporazione di BrdU nei miotubi Rb^{-/-} neanche in seguito ad incubazioni molto prolungate. Ciò stava ad indicare che, come ipotizzato, pRb non è coinvolta nel mantenimento dello stato postmitotico muscolare e che la preservazione dell'arresto definitivo della proliferazione dipende da un meccanismo pRb-indipendente.

RISULTATI

LA DELEZIONE DI Rb NON INDUCE SINTESI DI DNA NEI MIOTUBI TERMINALMENTE DIFFERENZIATI

Per investigare il ruolo di pRb nel mantenimento dello stato postmitotico del muscolo scheletrico, sono stati isolati mioblasti (muscle satellite cells, MSC) provenienti da topi RbLoxP omozigoti (MSC RbloxP). I mioblasti sono stati indotti a differenziare terminalmente e, a differenziamento ultimato, i miotubi derivanti sono stati infettati con una molteplicità di infezione (M.O.I.) di AdCre sufficiente a promuovere la delezione dell'esone 19 su entrambi gli alleli del gene Rb. L'escissione dell'esone 19 è stata valutata mediante PCR su DNA genomico estratto da miotubi terminalmente differenziati, infettati con AdCre o con un adenovirus di controllo. In assenza di ricombinazione l'amplificato ha una lunghezza di 700 bp; la delezione dell'esone 19 comporta una riduzione della lunghezza dell'amplificato di 400 bp. Nei miotubi infettati con AdCre la comparsa del solo amplificato prodotto della ricombinazione dimostra che la delezione è completa, cioè avvenuta su entrambi gli alleli, 48 h dopo l'infezione (Fig. 4 A). L'analisi condotta mediante Western Blotting (Fig. 4 B) e immunofluorescenza (IF) (Fig. 4 C) mostra che anche la scomparsa della proteina è completa 48 h dopo l'infezione con AdCre. Questi dati indicano che il sistema murino RbloxP consente di ottenere la soppressione completa di pRb nei miotubi terminalmente differenziati. L'eventuale reingresso in ciclo dei miotubi deleti di Rb (MtΔRb) è stato indagato valutando la presenza di sintesi di DNA. A tale scopo MtΔRb sono stati incubati con BrdU per più di 84 h dopo l'infezione con AdCre. L'assenza di incorporazione di BrdU, valutata per IF dimostra che i miotubi, nonostante la delezione di pRb non sintetizzano DNA (Fig. 5 A). E' stato dimostrato che l'espressione ectopica della ricombinasi Cre in cellule di mammifero può causare delezioni di regioni genomiche piuttosto estese (Loonstra et al., 2001). Allo scopo di dimostrare che la mancanza di sintesi di DNA non sia conseguenza di artefatti conseguenti all'espressione della ricombinasi Cre, i miotubi deleti di Rb sono stati superinfettati con l'adenovirus dl520, veicolante l'isoforma 12S dell'oncogene adenovirale E1A. dl520 è in grado di riattivare il ciclo cellulare nella virtuale totalità delle cellule terminalmente differenziate infettate (Crescenzi et al., 1995b).

dl520 ha indotto incorporazione di BrdU nel 95% delle cellule, percentuale simile a quella quantificabile in miotubi wild-type, dimostrando che i Mt Δ Rb conservano intatto il macchinario di sintesi del DNA (Fig. 5 B). Per verificare se il sistema RbloxP fosse valido per questo tipo di indagine, sono stati condotti sulle MSC RbloxP esperimenti simili a quelli che hanno consentito di dimostrare il ruolo essenziale svolto da pRb nel raggiungimento dello stato postmitotico del muscolo scheletrico. In questi esperimenti, mioblasti provenienti da topi Rb *knock-out* indotti a differenziare non raggiungevano lo stato postmitotico e continuavano a sintetizzare DNA (Novitch et al., 1996; Schneider et al., 1994). Per verificare che il sistema sperimentale RbLoxP rispondesse a questi criteri, in MSC RbloxP è stata indotta la delezione acuta di Rb mediante infezione con AdCre. Le MSC Δ Rb così ottenute sono state fatte differenziare per 72 h ed incubate con BrdU durante le successive 24 h. Una doppia fluorescenza per la catena pesante della miosina (MyHC), un fattore differenziativo muscolo-specifico, e per la BrdU ha evidenziato che il 44,9% dei miotubi esprimenti MyHC hanno incorporato BrdU durante il periodo indicato, in accordo con i dati presenti in letteratura (Novitch et al., 1996) (Fig. 5 C).

E' quindi possibile concludere che nel sistema RbloxP, la delezione di Rb previene l'ingresso nello stato postmitotico quando effettuata prima del differenziamento, ma è insufficiente a riattivare il ciclo cellulare se indotta a differenziamento ultimato.

E' stato recentemente dimostrato che la delezione acuta di Rb riattiva il ciclo cellulare in fibroblasti embrionali murini (MEF) quiescenti e senescenti (Sage et al., 2003). Per propositi comparativi, sono state isolate MEF da topi RbloxP omozigoti e, una volta rese quiescenti mediante deprivazione del siero, sono state infettate con una M.O.I. opportuna di AdCre (MEF Δ Rb) o con un adenovirus di controllo. Le MEF Δ Rb, in assenza di stimoli proliferativi, hanno mostrato un incremento di incorporazione di BrdU di quattro volte rispetto ai controlli (Fig. 6 A). In fig. 6 B è mostrata la completa scomparsa di pRb nelle MEF, 48 h dopo l'infezione con AdCre. Ciò conferma ulteriormente che i dati ottenuti promuovendo la delezione Cre-mediata di Rb in cellule RbloxP sono coerenti con i risultati presenti in letteratura.

La delezione di Rb nei miotubi TD provoca morte per apoptosi in un periodo compreso tra le 72 e le 96 h dopo l'infezione con AdCre. L'apoptosi non è una conseguenza dell'infezione, in quanto non si è manifestata né in seguito all'infezione delle MSC, né delle MEF RbloxP,

né tantomeno di miotubi TD *wild-type* (dati non mostrati). Per escludere l'ipotesi che la morte cellulare potesse precedere la sintesi di DNA e prevenire quindi l'ingresso in fase S, i miotubi sono stati coinfectati con AdCre ed un adenovirus veicolante il gene anti-apoptotico umano Bcl-2. L'espressione di Bcl-2 ha favorito notevolmente la sopravvivenza cellulare, incrementando di quattro volte, in diversi esperimenti, il numero di cellule vive 96 h dopo l'infezione con AdCre (Fig. 7). Tuttavia non è stata osservata incorporazione di BrdU fino a più di 120 h dall'infezione (dati non mostrati).

Questi risultati consentono di concludere che la delezione di Rb non perturba lo stato post-mitotico dei miotubi e che quest'ultimo è evidentemente preservato da un meccanismo pRb-indipendente.

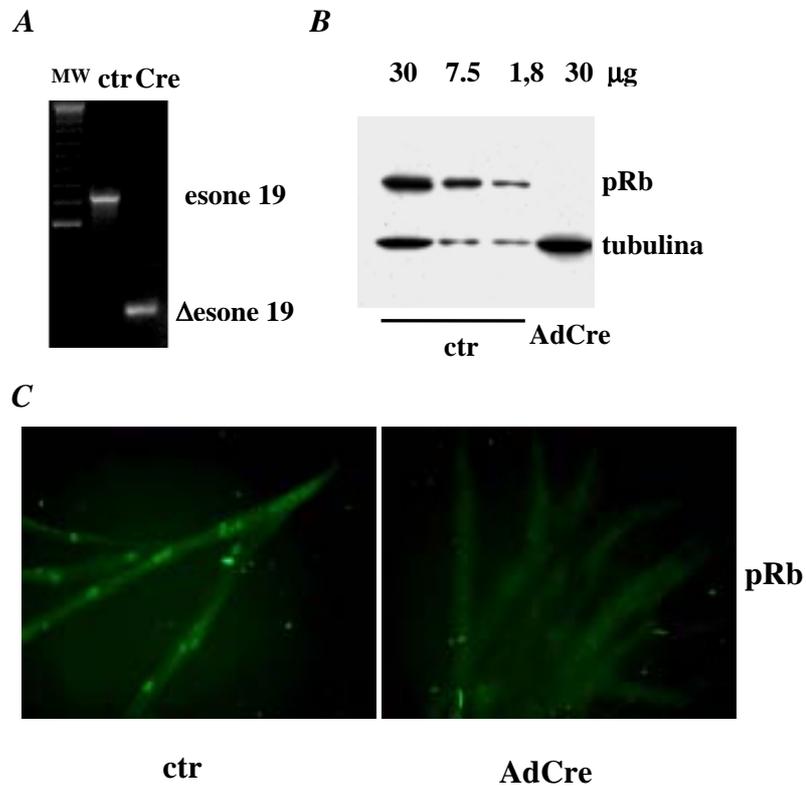


Figura 4. Delezione di Rb nei miotubi terminalmente differenziati. (A) PCR su DNA estratto da miotubi RbLoxP TD infettati con l'adenovirus virus di controllo (ctr) e con AdCre. Esone 19 indica il prodotto di amplificazione ottenuto da cellule in cui non è stata indotta la delezione, Δ Esone 19 indica l'amplificato ottenuto in seguito alla delezione. MW: 100 bp ladder. (B) Analisi di Western Blot per l'espressione di pRb su estratti di proteine totali provenienti da miotubi RbLoxP infettati con l'adenovirus di controllo (ctr) o con AdCre. Sono state caricate quantità decrescenti dell'estratto di controllo per valutare la sensibilità della marcatura. Tubulina: normalizzazione. (C) Analisi di immunofluorescenza per l'espressione di pRb in miotubi infettati con l'adenovirus di controllo o con AdCre.

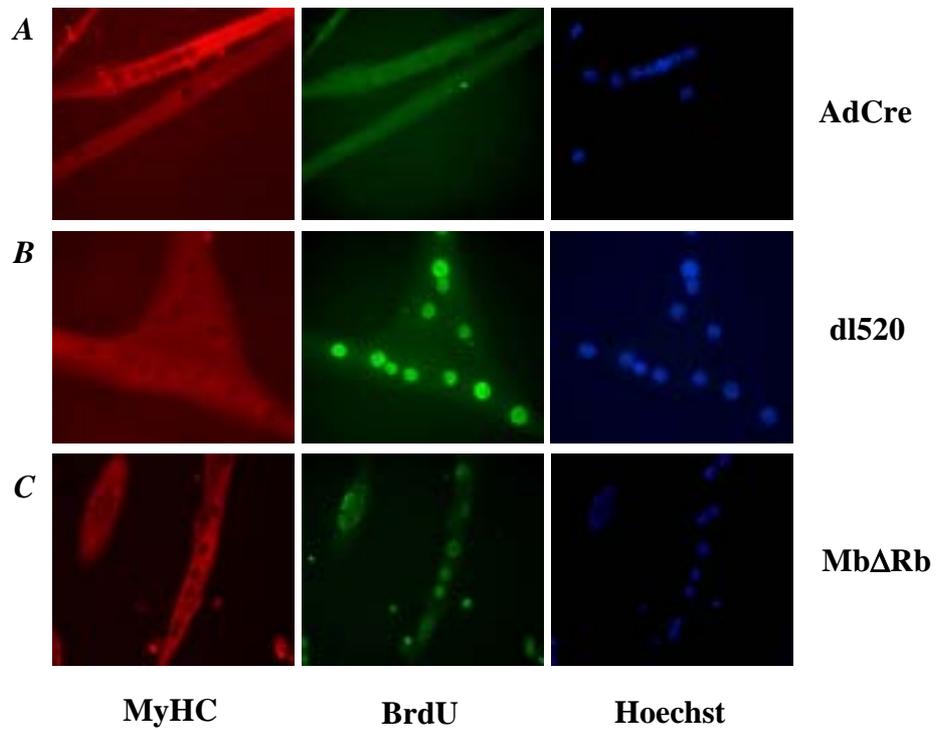


Figura 5. *La delezione di Rb nei miotubi terminalmente differenziati non induce sintesi di DNA.* Analisi di immunofluorescenza per l'espressione di MyHC e per l'incorporazione di BrdU effettuata su miotubi RbLoxP infettati con AdCre **A**), con dl520 **B**) e su MSC Δ Rb **C**).

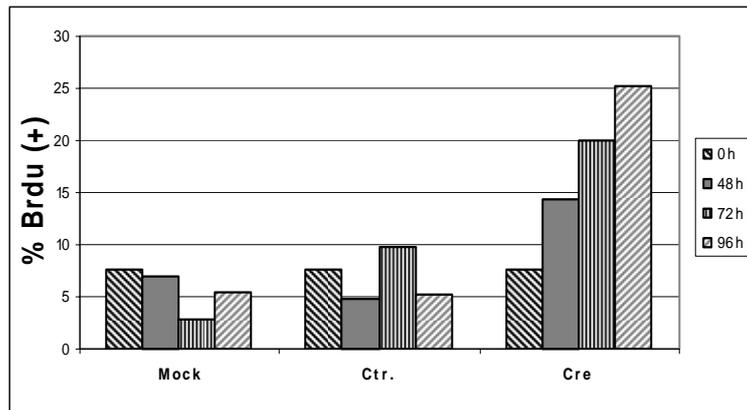
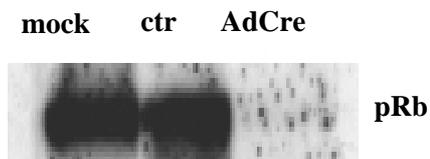
A**B**

Figura 6. La delezione di Rb in MEF quiescenti induce sintesi di DNA in assenza di stimoli proliferativi. (A) MEF RbLoxP sono state rese quiescenti coltivandole per 48 h in terreno contenente 0,1% di siero fetale bovino. Le MEF RbLoxP quiescenti sono state quindi infettate come indicato (adenovirus di controllo o AdCre alla M.O.I 600). Le MEFΔRb sono state quindi incubate per 24 h con BrdU e fissate ai tempi indicati. L'incorporazione di BrdU è stata valutata mediante IF. (B) Analisi di Western Blotting per l'espressione di pRb su estratti di proteine totali provenienti da MEF RbLoxP 48 h dopo l'infezione con i virus indicati.

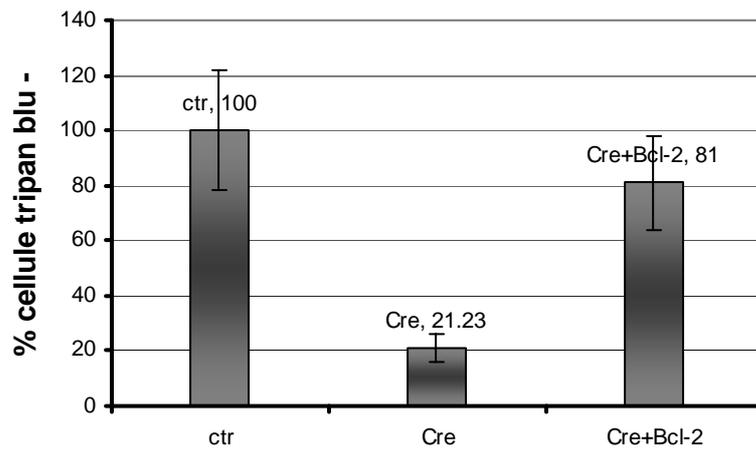


Figura 7. Il gene anti-apoptotico *Bcl-2* promuove la sopravvivenza dei *MtΔRb*. I miotubi RbLoxP TD sono stati coinfectati con AdCre e con AdBcl-2, o con solo AdCre con l'adenovirus di controllo. La sopravvivenza è stata valutata mediante esclusione con tripan blu. In grafico sono riportate le percentuali medie ottenute da tre esperimenti diversi, riferite ai miotubi infettati con il virus di controllo.

***LA DELEZIONE DI Rb NEI MIOTUBI TERMINALMENTE DIFFERENZIATI
RIATTIVA L'ESPRESSIONE DI GENI REGOLATORI DEL CICLO
CELLULARE***

E' noto che pRb è un inibitore dell'attività trascrizionale dei fattori E2F e che svolge tale attività interagendo direttamente con essi. Nei miotubi TD pRb è nella sua forma attiva, ipofosforilata, complessata agli E2F (Lipinski and Jacks, 1999). Poiché molti dei geni che controllano la transizione G₁-S sono sotto il controllo di questi fattori trascrizionali, è opinione comune che l'inibizione della trascrizione operata da pRb sia fondamentale per prevenire il reingresso in ciclo dei miotubi. Nonostante la completa delezione di Rb non abbia provocato alcuna alterazione apparente dello stato postmitotico, era ipotizzabile che rimuovendo pRb nei miotubi venisse contemporaneamente rimossa anche l'inibizione alla loro attività trascrizionale. Per verificare questa ipotesi sono stati condotti dei saggi di attività luciferasica utilizzando un costrutto in cui il gene codificante la luciferasi era sotto il controllo di un promotore controllato da E2F. A tale scopo MSC RbloxP sono state trasfettate stabilmente con questo costrutto, indotte a differenziare terminalmente e, i miotubi risultanti, infettati con AdCre. La Fig 8 mostra che l'attività trascrizionale di E2F, facilmente rilevabile nelle MSC, subisce una notevole riduzione nei miotubi TD. La situazione cambia drasticamente nei MtΔRb, dove l'attività trascrizionale raggiunge il livello misurato nei mioblasti. Quindi l'ipotesi che in seguito alla delezione di Rb i fattori E2F avrebbero riacquisito le proprietà transattivoattive è stata confermata.

Per determinare se l'attività trascrizionale di E2F rilevata nei MtΔRb attivasse l'espressione dei geni regolatori dell'ingresso nella fase S del ciclo cellulare, sono stati condotti esperimenti di microarray. In questi esperimenti è stato confrontato il profilo di espressione dei MtΔRb, con quello dei miotubi infettati con un virus di controllo, e delle MSC. In tabella 2 sono mostrati i valori relativi ad alcuni dei geni la cui espressione è variata in questi esperimenti di microarray. Questi geni corrispondono esattamente a quelli che in esperimenti condotti su fibroblasti murini (Ishida et al., 2001), sono regolati da E2F. Tra i geni la cui trascrizione è indotta in seguito alla delezione di Rb, si riscontrano non solo alcuni regolatori della transizione G₁-S, come la ciclina E, e della progressione nella fase S ed M, come le cicline A e B, ma anche geni che svolgono attività enzimatica durante la replicazione del DNA (topoisomerasi, ligasi, PCNA). In figura 9 sono mostrati i valori di espressione normalizzati di

tutti i geni mostrati nella tabella. Da questo grafico è evidente che, in maniera concorde ai saggi di luciferasi, la maggior parte dei geni regolati da E2F (26 su 28) mostrano una ridotta espressione nei miotubi TD, mentre i loro livelli di espressione aumentano significativamente in seguito alla delezione di Rb.

Per verificare che in seguito alla delezione di Rb, le cicline che regolano la transizione G₁-S fossero espresse oltre che al livello trascrizionale, anche al livello proteico, sono stati condotti esperimenti di Western Blotting. La figura 10 A mostra che le proteine ciclina E ed A, che agiscono normalmente in prossimità della transizione G₁-S, sono espresse nei MTΔRb a livelli simili a quelli riscontrati nelle MSC. Al contrario, l'espressione della ciclina D1, che esercita la sua funzione nella fase G1 precoce, non era indotta in seguito alla delezione di Rb. La figura 10 B mostra che la ciclina A è correttamente localizzata nel nucleo dei MTΔRb. Ciò consente di escludere la possibilità che la mancata sintesi di DNA nei MTΔRb sia una conseguenza dell'assenza di attività della ciclina A dovuta alla sua scorretta localizzazione cellulare.

I saggi chinasi presentati in figura 11 dimostrano che, non solo le cicline E ed A sono espresse nei MTΔRb, ma che ad esse è associata attività chinasi. I più elevati livelli di attività chinasi di entrambe le cicline nei MTΔRb rispetto alle MSC sono probabilmente dovuti al fatto che sono stati confrontati miotubi di fatto sincroni con mioblasti non sincronizzati.

Come mostrato in figura 12 A nei MTΔRb viene ripristinata l'espressione di alcuni fattori coinvolti nella replicazione del DNA, quali PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), MCM2 (Minichromosome Maintenance Deficient 2), Ligasi I, e RPA70 (Replication Protein A). Anche in questo caso l'espressione di questi fattori è paragonabile a quella dei mioblasti. Per verificare in quale momento della fase S (precoce, media o tardiva) si trovassero i nuclei dei MTΔRb, è stata analizzata mediante IF la distribuzione subnucleare di PCNA e della DNA ligasi I (Hozak et al., 1994; Montecucco et al., 1995). Nella maggioranza dei MTΔRb, sia PCNA (fig. 12 B), che la DNA ligasi I (non mostrato) presentavano nel nucleoplasma una distribuzione diffusa, sottile e punteggiata, ben diversa da quella mostrata nei miotubi infettati con dl520, in cui PCNA ha una localizzazione più definita e colocalizza con i siti di incorporazione di BrdU. Questi dati suggeriscono che i MTΔRb si arrestano in corrispondenza della transizione G1/S.

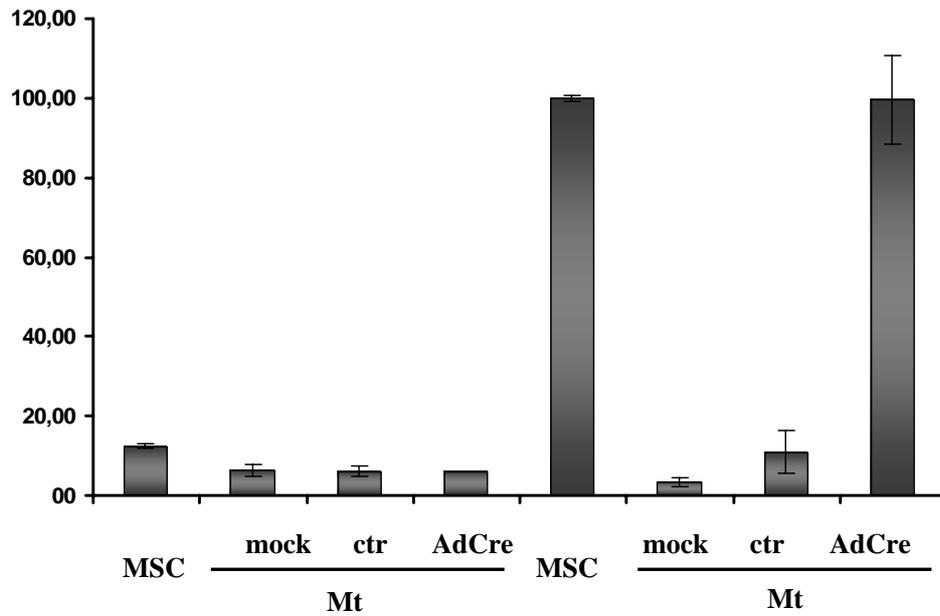


Figura 8. Recupero dell'attività trascrizionale dei fattori E2F in miotubi ΔRb . Attività di luciferasi misurata in MSC trasfettate stabilmente con un costrutto reporter di controllo (Basic), o responsivo a E2F (6x2F) e nei miotubi da esse derivati infettati con i virus indicati. I valori sono una media di due esperimenti indipendenti e sono espressi come percentuale dei valori ottenuti nelle MSC-6x2F

TABELLA 2. Geni regolati da E2F la cui espressione varia in seguito alla delezione di Rb in miotubi TD.

Affimetrix ID	Gene Name	Gene symbol	MSC	Mt.-Ctr.	Mt.-Cre
92551_at	Ligase I, DNA, ATP-dependent	Lig1	120	25.8	126.8
92790_at	Karyopherin (importin) alpha 2	Kpna2	230.55	73	138.1
93250_r_at	High mobility group box 2	HMGb2	142.3	24.1	148.9
93356_at	Minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	Mcm7	174.35	58.6	344.9
94024_at	Retroviral integration site 2	Ris2	325.15	71.3	449.9
94294_at	Ciclin B2	Ccnb2	516.65	116.3	372.7
96081_at	Thymidine kinase 1	Tk	205.75	56.5	163.4
97909_at	Stathmin 1	Stmn1	714.7	136.3	502.7
98039_at	RIKEN cDNA 2410015M20 gene	2410015M20Rik	154.1	213.3	183.8
99186_at	Cyclin A2	Ccna2	304	78.6	266.8
99578_at	Topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	189.9	12.65	155.3
100062_at	Minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	Mcm3	164.9	45	262.5
100128_at	Cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	Cdc2a	435.15	35.5	372.8
100612_at	Ribonucleotide reductase M1	Rrm1	289.5	198.2	485.9
101065_at	Proliferating cell nuclear antigen	Pcna	1189.9	190.7	1797.1
102001_at	Ribonucleotide reductase M2	Rrm2	1024	293.95	1452.4
103034_at	Cyclin E1	Ccne1	204.05	106.25	456.3
104333_at	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	D17H6S56E-5	278.05	14.8	274.6
104527_at	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	Rad51	144.15	36.1	219.1
94412_at	Cyclin-dependent kinase 2	Cdk2	169	196.2	578.1
96772_at	DNA primase, p49 subunit	Prim 1	56.9	5.05	71.8
97327_at	Flap structure specific endonuclease 1	Fen 1	117.35	37.35	264.7
97421_at	SMC2 structural maintenance of chromosomes 2 like 1 (ye)	Smc2l1	412.65	43.2	203.8
97948_at	Retinoblastoma1	Rb1	102.2	165.45	18.3
98469_at	Aurora kinase B	Aurk	150.4	11.15	74.8
98471_f_at	Kinesin family member C1	Kifc1	232.85	23.6	270.4
99457_at	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	Mki67	266.7	14.7	155.6
99917_at	Enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	Ezh2	301.2	114.6	340.9
93236_s_at	Thymidylate synthase	Tyms	96	35.05	82.6

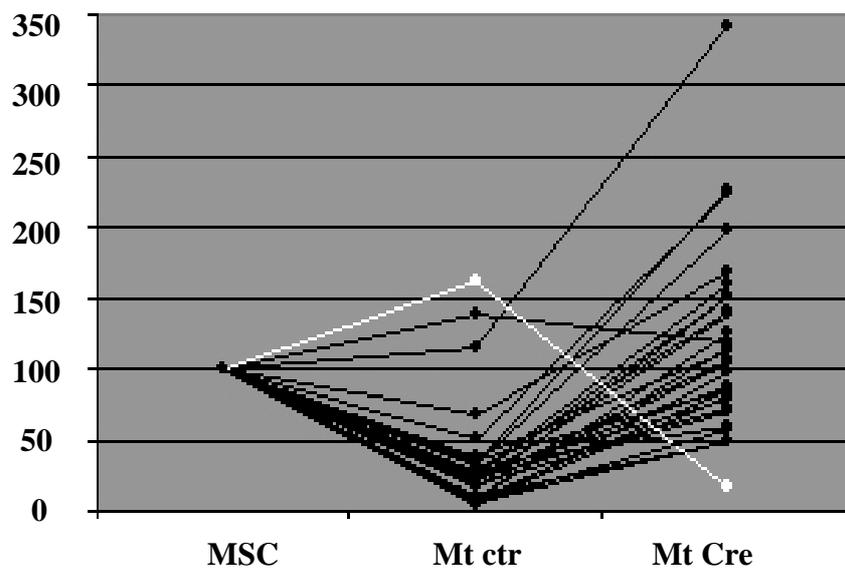


Figura 9. Analisi dei dati di microarray. Analisi dei dati di microarray effettuato su cRNA proveniente da MSC e miotubi infettati con AdCre o con un adenovirus di controllo. Ogni linea rappresenta un mRNA distinto; i valori sono una media di due esperimenti indipendenti e sono mostrati come percentuale dei valori ottenuti nelle MSC (vedi tabella 1); linea bianca: mRNA di pRb.

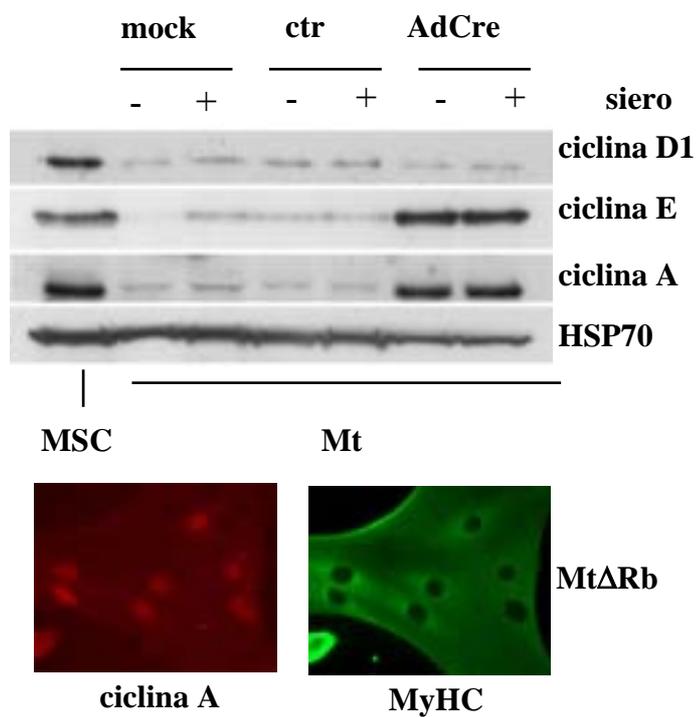


Figura 10. *Espressione delle cicline E ed A nei miotubi ΔRb.* **A)** Analisi di Western Blotting delle proteine indicate nelle MSC e nei miotubi mock o infettati con AdCre o con il virus di controllo, in presenza o assenza di 5% FBS; HSP70: normalizzazione. **B)** IF per MyHC e ciclina A in MTΔRb.

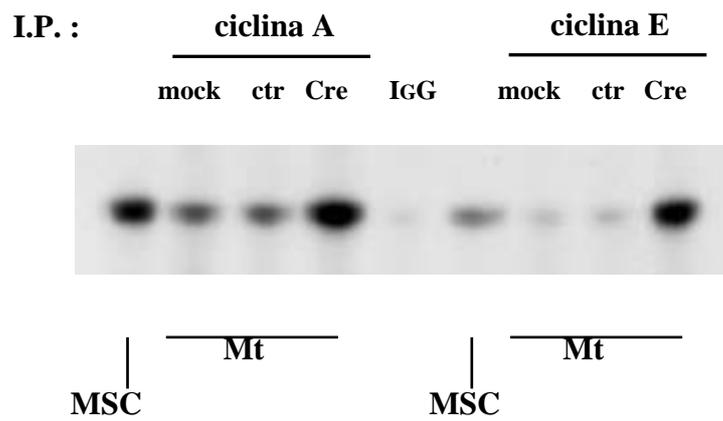


Figura 11. Attività chinasi associata alle cicline E ed A. L'attività chinasi associata alle cicline E ed A è stata valutata nei mioblasti (MSC), in miotubi mock, o infettati con AdCre o con un virus di controllo.

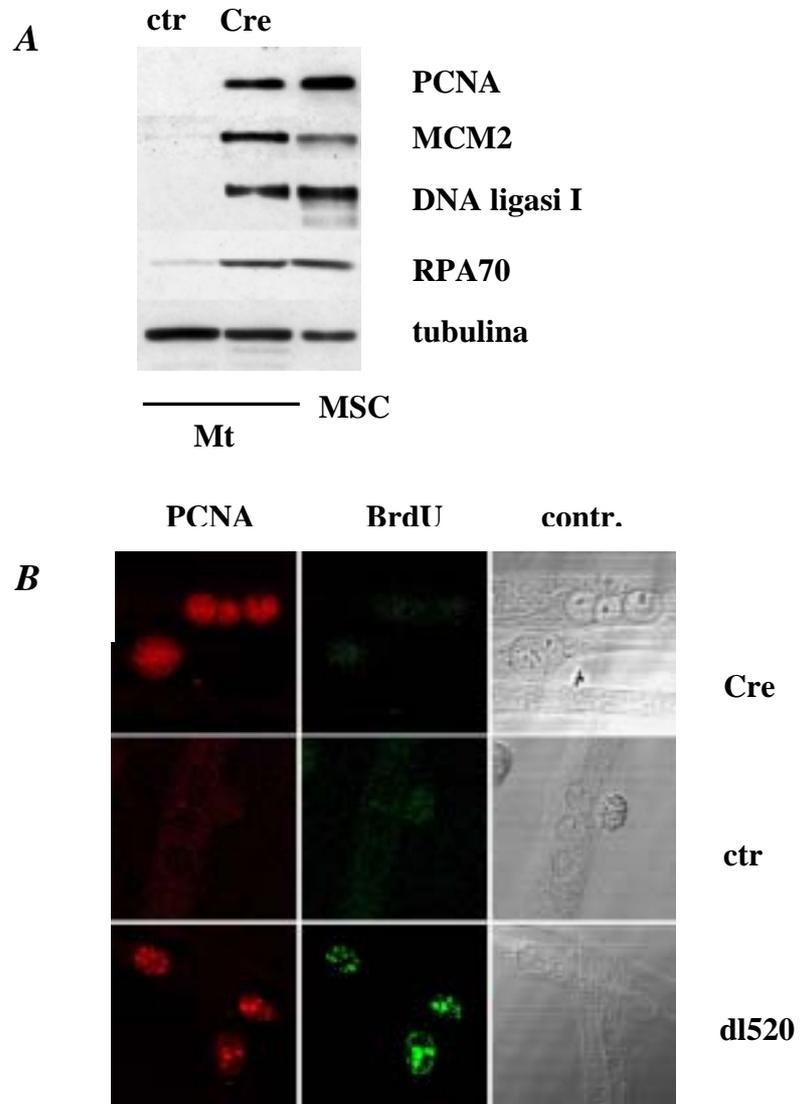


Figura 12. Riattivazione di fattori coinvolti nella sintesi del DNA in *MtΔRb*. **A)** Analisi di Western Blotting per le proteine PCNA, MCM2, DNA Lig.1, RPA70 in MSC e miotubi infettati come indicato. Tubulina: normalizzazione. **B)** Analisi di immunofluorescenza al microscopio confocale per l'espressione di PCNA e BrdU in miotubi infettati come indicato.

LA COSTANTE PRESENZA DI pRb NEI MIOTUBI TERMINALMENTE DIFFERENZIATI È NECESSARIA PER L'OTTIMALE ESPRESSIONE DEI GENI TARDIVI MUSCOLO-SPECIFICI

Nel corso del differenziamento del muscolo scheletrico l'ottimale espressione di alcuni marcatori muscolari dipende dalla presenza di pRb (Novitch et al., 1999). Per verificare se pRb fosse richiesta anche per la loro permanente espressione nei miotubi TD, sono stati esaminati i dati ottenuti dagli esperimenti di microarray. I livelli di trascrizione di vari geni muscolo-specifici nei MtΔRb sono stati confrontati con quelli di miotubi infettati con il virus di controllo. I geni mostrati in tabella 3 subivano una notevole riduzione di espressione (compresa tra il 66 e il 15 %) già 48 h dopo l'infezione con AdCre. E' probabile che il breve intervallo di tempo intercorso tra l'infezione con AdCre e l'estrazione dell'RNA abbia portato a sottostimare il valore della riduzione di espressione considerando la variabilità di persistenza dei diversi trascritti.

Il quadro generale fornito dall'analisi dello stato del differenziamento ottenuto con i microarray, consente di concludere che nonostante pRb non sia richiesta per il mantenimento dello stato postmitotico nei miotubi TD, la sua presenza continui ad essere necessaria per l'ottimale espressione dei geni tessuto specifici anche a differenziamento completato.

TABELLA 3. Geni muscolo-specifici la cui trascrizione subisce variazioni in seguito alla delezione di Rb

Affimetrix ID	Gene Name	MSC	Mt.-Ctr.	Mt.-Cre	Cre/Ctr (%)
94763_at	Muscle localized kinase 2 (MLK2)	27	137.4	46.8	-66
161569_f_at	Creatine kinase, muscle	8.5	258.8	96.9	-62.6
92436_at	Muscle-specific serine kinase 1	23	237.7	95.7	-59.8
92599_at	Phosphoglycerate mutase muscle-specific subunit	35.9	1300.8	585.7	-55
101128_at	Dihydropyridine sensitive skeletal muscle calcium channel	38.5	618.2	309	-50
160753_at	Myosine Heavy chain, skeletal muscle embryonic	139.3	3322.5	1842.7	-44.5
160243_r_at	Myosine Heavy chain, skeletal muscle perinatal	22.8	1766.7	1059.3	-40
100003_at	RyR1 mRNA for skeletal muscle ryanodine receptor	101.6	813.6	498.5	-38.7
100896_at	Skeletal muscle calcium channel, gamma-subunit	161.1	613.1	380.9	-37.9
160354_at	Skeletal and cardiac muscle-specific protein	19.4	749	468.6	-37.4
98561_at	Slow skeletal muscle troponin I (Tnni1 gene)	467.4	9307.5	6104.4	-34.4
100381_at	Actin, alpha 1, skeletal muscle Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, fast twitch	544.8	12677.1	9043.7	-28.7
98126_s_at	1	118.2	1337.4	968.8	-27.6
103084_at	Muscle LIM protein	22	224.2	162.9	-27.3
103053_at	Myogenin	290.9	1681.5	1235.1	-26.5
102426_at	Skeletal muscle calsequestrin	154.4	1634.3	1265.8	-22.5
93084_at	Adenine nucleotide translocator 1, skeletal muscle	1256.4	2236.8	1754.9	-21.5
98496_at	Muscle glycogen synthase (Gys)	212.6	786.9	631.6	-19.7
92541_at	MLC1F/MLC3F myosin alkali light chain (fast skeletal muscle isoform)	366.8	10477.7	8942.8	-14.6

IL COMPLESSO CHINASICO CICLINA D1/CDK4 INATTIVA IL MECCANISMO pRb-INDIPENDENTE CHE OSTACOLA LA SINTESI DI DNA NEI MIOTUBI Δ Rb

E' stato precedentemente dimostrato che la coespressione delle proteine ciclina D1 e cdk4 è in grado di indurre miotubi TD a sintetizzare DNA (Latella et al., 2001). Poiché pRb è certamente il principale bersaglio di ciclina D1, ma non l'unico, ci siamo chiesti se quest'ultima fosse ancora in grado di indurre l'ingresso in fase S dei Mt Δ Rb. Quindi Mt Δ Rb sono stati superinfettati con gli adenovirus ricombinanti esprimenti ciclina D1 e cdk4 (AdcycD1 e Adcdk4). Nonostante i Mt Δ Rb siano stati superinfettati con una m.o.i. di infezione di AdcycD1 e Adcdk4 insufficiente a riattivare i miotubi *wild-type* (m.o.i 40 e 500 rispettivamente contro le m.o.i. 60 e 770 richieste per l'ingresso in fase S dei miotubi *wild-type*), il 70 % di essi sintetizzava DNA (Fig. 13).

Questo dato dimostra che il meccanismo pRb-indipendente che nei miotubi TD preserva lo stato postmitotico è inattivabile dal complesso chinasi ciclina D1/cdk4. Inoltre questi risultati indicano che nei miotubi TD esiste almeno un altro importante bersaglio, oltre a pRb, per queste proteine.

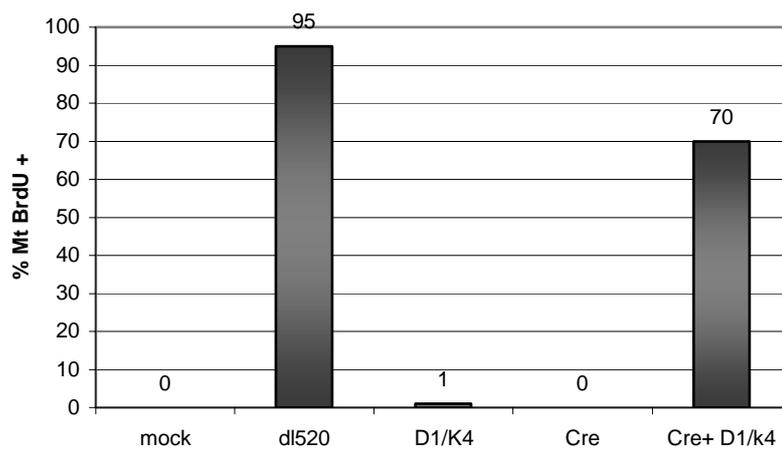


Figura 13. *Il complesso chinasi ciclina D1/cdk4 promuove l'ingresso in fase S dei Mt Δ Rb.* Analisi di I.F. per incorporazione di BrdU in MtRbLoxP infettati come indicato. In grafico sono mostrate le percentuali dei Mt che hanno incorporato BrdU.

***NESSUNO DEI COMPONENTI DELLA FAMIGLIA DELLE PROTEINE
“POCKET” È RESPONSABILE DEL MANTENIMENTO DELL’ARRESTO
PROLIFERATIVO NEI MIOTUBI TERMINALMENTE DIFFERENZIATI***

E' stato ipotizzato che p107, una delle proteine appartenenti alla famiglia di pRb, la cui espressione viene notevolmente incrementata nei mioblasti Rb^{-/-}, possa almeno parzialmente sostituire pRb nell'induzione dello stato postmitotico (Schneider et al., 1994). Inoltre nei miotubi TD, p130, oltre pRb, è associata ai complessi di regolazione della trascrizione contenenti i membri di fattori trascrizionali E2F e DP (Corbeil et al., 1995; Havely et al., 1995; Shin et al., 1995). Analisi di Western blotting hanno confermato che i livelli proteici di p107 vengono prontamente innalzati in seguito alla delezione acuta di Rb in miotubi TD. Al contrario l'espressione dell'altra proteina “*pocket*”, p130, rimaneva essenzialmente invariata (Fig. 14). Inoltre, poiché non solo pRb, ma tutte le proteine appartenenti a questa famiglia sono substrati di fosforilazione di ciclina D1/cdk4 (Farkas et al., 2002; Leng et al., 2002; Xiao et al., 1996), era plausibile ipotizzare che il meccanismo di arresto del ciclo cellulare dei MtΔRb all'inizio della fase S, fosse sotto il controllo di p107 e/o p130. Il reingresso in ciclo dei miotubi ΔRb indotto dal complesso chinasi ciclina D1/cdk4 potrebbe quindi essere una conseguenza della inattivazione, mediante fosforilazione cdk4-mediata, di entrambe le restanti proteine “*pocket*”. Per verificare ciò sono stati condotti esperimenti di delezione di Rb in cellule prive delle altre due proteine “*pocket*”. A tale scopo ci siamo avvalsi di MEF in cui i geni delle tre proteine appartenenti alla famiglia di pRb sono stati inattivati (MEF triple knockout, TKO) (Sage et al., 2000). Le MEF TKO sono state infettate con un retrovirus esprimente una forma del cDNA di Rb escindibile, con la ricombinasi Cre (cfr. Procedure Sperimentali), e con il retrovirus di controllo Bbxp. Le popolazioni policlonali ottenute dalla successiva selezione con fleomicina (Rb1 e Rb2), sono state convertite in mioblasti grazie all'espressione di MyoD e indotte a differenziare. I miotubi sono comparsi in tre giorni, sia nella popolazione esprimente pRb, sia in quella di controllo. Questi miotubi sono stati quindi infettati con AdCre o con un adenovirus di controllo (Fig. 15), e la sintesi di DNA è stata valutata mediante IF doppia, per MyHC e BrdU. Sebbene non sia stato possibile ottenere una popolazione che esprimesse pRb in maniera omogenea, in tre esperimenti indipendenti, ciascuno effettuato utilizzando due diverse linee cellulari in cui l'espressione di pRb era stata ricostituita, il numero di

miotubi che raggiungevano lo stato postmitotico (negativi alla marcatura con BrdU) aumentava, dal $39,3 \pm 6,6\%$ nelle cellule Rb^- , al $61,8 \pm 12,2\%$ nelle cellule Rb^+ (media \pm D.S.). Ciò indicava che la ricostituzione dell'espressione di pRb nelle cellule TKO consentiva ad una frazione significativa di mioblasti di raggiungere lo stato postmitotico. Successivamente, come mostrato in figura 16 A, pRb è stata rimossa mediante infezione con AdCre, ma non è stata osservata una significativa riduzione nel numero di miotubi BrdU (-) (Fig. 16 B). Questo esperimento mostra che pRb è in grado di stabilire lo stato postmitotico anche in assenza delle altre proteine "*pocket*". Fatto più importante, il dato ottenuto dimostra che la delezione di Rb in miotubi terminalmente differenziati non induce replicazione di DNA, anche in una situazione in cui nessuna delle proteine "*pocket*" è presente.

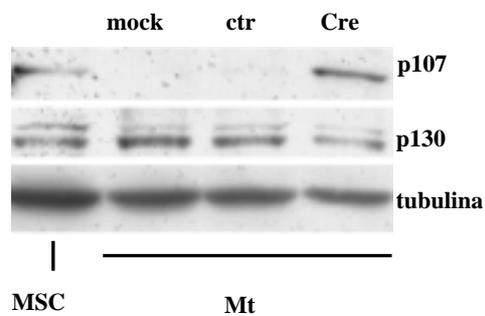


Figura 14. *Livelli di espressione di p107 e p130 nei Mt Δ Rb.* Analisi di Western blotting per le proteine p107 e p130 in miotubi infettati come indicato e nelle MSC. Tubulina:normalizzazione

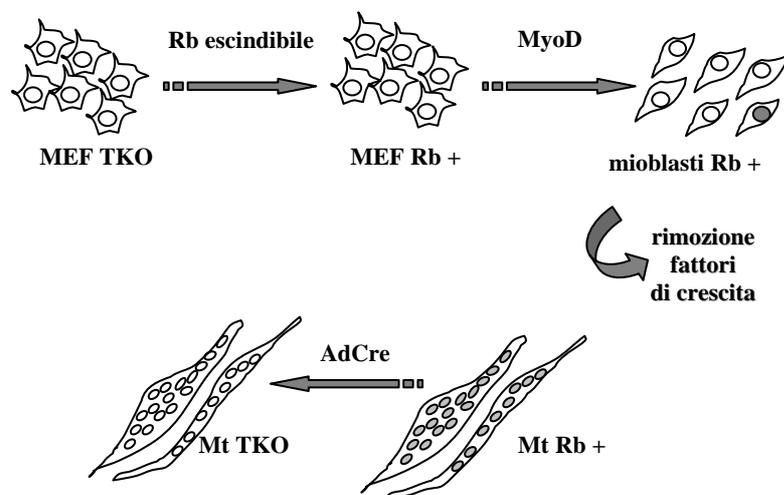


Figura 15. *Rappresentazione schematica delle tappe necessarie per la produzione di MtTKO*

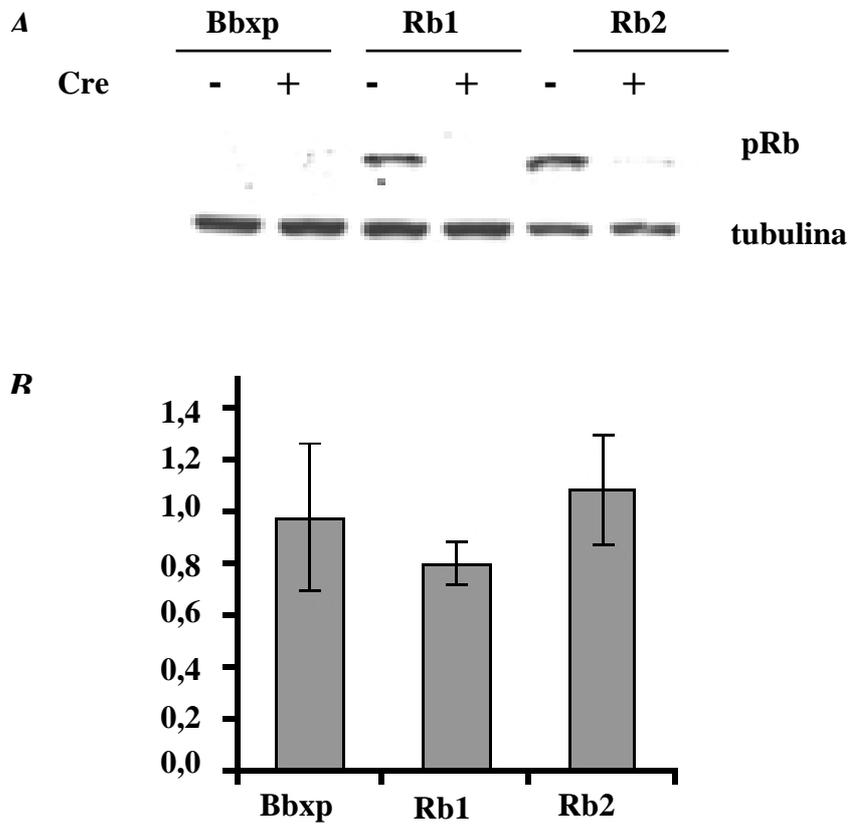


Figura 16. Ruolo di pRb, p107 e p130 nel mantenimento dello stato postmitotico del muscolo scheletrico. **A)** Miotubi derivanti da MEF TKO infettate con il virus di controllo (Bbxp) o provenienti da due diverse popolazioni infettate con un retrovirus esprime il cDNA escindibile di Rb (Rb1 e Rb2), sono stati infettati con AdCre o con il virus di controllo. L'analisi di Western blotting è stata condotta su estratto totale di proteine. **B)** Analisi di incorporazione di BrdU effettuata sulle stesse popolazioni mostrate in A). Il grafico mostra i valori medi e le deviazioni standard di tre esperimenti indipendenti mostrati come rapporto tra i miotubi BrdU⁻ nelle popolazioni infettate con AdCre (Rb⁻) e i miotubi BrdU⁻ nelle popolazioni infettate con il virus di controllo (Rb⁺).

DISCUSSIONE

I risultati mostrati in questo lavoro consentono di concludere che, a dispetto di quanto generalmente ritenuto finora, lo stato postmitotico delle cellule muscolari è preservato da un meccanismo pRb-indipendente. La convinzione che pRb fosse essenziale nel mantenimento dell'arresto proliferativo, derivava principalmente dall'evidenza che pRb gioca un ruolo assolutamente fondamentale nell'uscita definitiva dal ciclo cellulare (Schneider et al., 1994; Novitch et al., 1996). Inoltre il fatto che nei miotubi TD, pRb fosse espressa a livelli più elevati che nei precursori proliferanti (Coppola et al., 1990), e che si trovasse associata ai fattori E2F (Corbeil et al., 1995; Havely et al., 1995; Shin et al., 1995), induceva a ritenere che lo stato postmitotico fosse preservato con lo stesso meccanismo con cui veniva indotto, cioè, presumibilmente, reprimendo l'attività trascrizionale dei fattori E2F (Lipinski and Jacks, 1999). Questo effettivamente sembra essere il mezzo con cui viene mantenuto lo stato di quiescenza. E' stato infatti dimostrato che MEF indotte in quiescenza e successivamente private di pRB esprimevano geni notoriamente sotto il controllo di E2F e riprendevano a replicare il DNA, in assenza di stimoli proliferativi (Sage et al., 2003). Tuttavia, l'ipotesi che la repressione trascrizionale dei fattori E2F fosse il meccanismo con il quale pRb preservasse lo stato postmitotico muscolare, sembrava smentita dall'evidenza che la forzata espressione di E2F-1 e 4 non era sufficiente a portare i miotubi TD in fase S (Pajalunga et al., 1999; Puri et al., 1998). Ad avvalorare l'ipotesi del coinvolgimento di pRb nel mantenimento dello stato postmitotico, ha contribuito invece, l'evidenza che la sintesi di DNA nei miotubi TD poteva essere indotta con oncogeni di virus a DNA, quali l'antigene T di SV40 e E1A (Endo and Nadal-Ginard, 1989; Crescenzi et al., 1995b). D'altra parte l'oncogene E7 di papillomavirus, pur legando e degradando pRb, non promuoveva sintesi di DNA nei miotubi terminalmente differenziati (Sacco et al., 2003). Lo stesso accadeva quando si esprimevano nei miotubi molecole notoriamente in grado di inattivare pRb, come Id2, MDM2, e le proteine IE1 e IE2 di citomegalovirus. Evidenze contraddittorie derivavano anche dalla ricostituzione delle attività chinasiche delle ciline D1 ed E nei miotubi TD. Mentre il complesso ciclina E/cdk2, pur fosforilando pRb non perturbava lo stato postmitotico delle cellule muscolari, ciclina D1/cdk4 promuoveva attivamente il loro ingresso in fase S (Latella et al., 2001). Seppur valide,

tutte queste osservazioni sono indirette, in quanto l'unico modo per verificare il coinvolgimento di pRb nel mantenimento dello stato postmitotico è la sua inattivazione nelle cellule che sono già definitivamente uscite dal ciclo cellulare, evento, quest'ultimo, che deve avvenire necessariamente in sua presenza. Abbiamo raggiunto questo scopo grazie ai mioblasti *knockout* condizionali RbloxP. Queste cellule sono state indotte a differenziare terminalmente in presenza di pRb, e successivamente è stata indotta la completa delezione del gene Rb mediante infezione con AdCre (Fig.4 A). Nonostante la completa scomparsa di pRb (Fig. 4 B, C), i miotubi TD sono rimasti postmitotici (Fig. 5 A). Per verificare che l'assenza di sintesi di DNA non fosse una conseguenza dell'espressione della ricombinasi Cre, nota per creare delezioni di tratti di genoma molto estese (Loonstra et al., 2001), abbiamo pensato di verificare la capacità dei Mt Δ Rb di rientrare in fase S. A questo scopo Mt Δ Rb sono stati infettati con l'adenovirus ricombinante dl520, che esprime l'isoforma 12S di E1A, precedentemente dimostrato essere in grado di indurre sintesi di DNA nei miotubi (Crescenzi et al., 1995b). Il fatto che l'espressione di E1A fosse sufficiente a promuovere l'ingresso in fase S dei miotubi in cui pRb era stata depleta, dimostrava che l'apparato di replicazione del DNA era funzionale (Fig. 5 B). Inoltre il fatto che esperimenti condotti sui mioblasti RbloxP abbiano consentito di riprodurre le evidenze note in letteratura sul ruolo di pRb nel mantenimento dello stato postmitotico (Fig. 5 C) (Schneider et al., 1994) e della quiescenza (Fig. 6 A) (Sage et al., 2003), rendeva il sistema RbloxP attendibile.

Successivamente è stata anche esclusa l'ipotesi che la morte per apoptosi, cui incorrevano i miotubi tra le 72 e le 96 h dopo l'infezione con AdCre, potesse temporalmente precedere la replicazione del DNA. L'inibizione della morte cellulare, ottenuta esprimendo nei Mt Δ Rb il gene anti-apoptotico Bcl-2, ci ha consentito di prolungare il tempo di osservazione oltre le 120 h dall'infezione. Nonostante ciò non è stata osservata incorporazione di BrdU (Fig.7).

Nel loro insieme questi risultati permettono di concludere che lo stato postmitotico è preservato da un meccanismo pRb-indipendente. Questa conclusione distingue i miotubi TD dalle cellule quiescenti e senescenti, nelle quali l'arresto proliferativo è, al contrario, dipendente da pRb (Sage et al., 2003). E' anche importante sottolineare che i dati presentati svelano l'unicità del controllo del ciclo cellulare nei miotubi TD, e contribuiscono a spiegare la loro rimarchevole refrattarietà agli stessi stimoli proliferativi, cui sono invece sensibili le cellule non terminalmente differenziate

(Tiainen et al., 1996b). I risultati mostrati finora sono stati confermati *in vivo* da Rudniki e collaboratori in un lavoro recentissimo in cui è stato utilizzato un sistema *knockout* condizionale che ha consentito di eliminare pRb a differenziamento completato (Huh et al., 2004)

In base a quanto mostrato finora, la delezione di Rb non altera lo stato post-mitotico dei miotubi TD, ma i dati successivi indicano che non preclude il reingresso dei miotubi nel ciclo cellulare. Infatti i Mt Δ Rb rientrano nel ciclo cellulare e lo percorrono fino alla transizione G₁/S. In seguito alla delezione di Rb l'attività trascrizionale E2F-specifica veniva ripristinata a livelli simili a quelli riscontrati nei mioblasti proliferanti (Fig. 8). L'analisi di microarray dimostrava che la delezione di Rb comportava la riattivazione dell'espressione di 26 geni la cui trascrizione è sotto il controllo dei fattori E2F (Fig. 9) (Ishida et al., 2001). Tra questi geni vi erano regolatori della progressione attraverso le fasi G₁ e S, ed enzimi coinvolti nella replicazione del DNA (Tabella 2). L'espressione della ciclina D1, che esercita la sua funzione nella fase G₁ precoce non subiva variazioni in seguito alla delezione di Rb. Al contrario le cicline E ed A, raggiungevano livelli proteici simili a quelli rilevabili nei mioblasti proliferanti (Fig. 10 A). Inoltre ad entrambe era associata attività chinastica, anch'essa confrontabile con quella rilevata in mioblasti proliferanti (Fig.11). Infine, la ciclina A era correttamente localizzata nel nucleo (Fig. 10 B).

Come già gli esperimenti di microarray avevano evidenziato, in seguito alla delezione di Rb veniva attivata l'espressione di molti geni coinvolti nella replicazione del DNA (Tabella 2). Nonostante i livelli di espressione di alcune proteine effettrici della sintesi del DNA, raggiungessero quelli riscontrati nei mioblasti (Fig. 12 A), la distribuzione nucleare diffusa, poco localizzata e punteggiata di PCNA (Fig. 12 B) suggeriva l'arresto dei Mt Δ Rb in corrispondenza della transizione G₁/S.

Questi risultati indicano che pRb, pur non essendo essenziale per il mantenimento dello stato postmitotico delle cellule muscolari, ha un ruolo nella prevenzione del reingresso nel ciclo cellulare. Ciò è dimostrato dal fatto che i miotubi Δ Rb percorrono la fase G₁ media e tardiva, arrestandosi in corrispondenza dell'ingresso in fase S. Inoltre il meccanismo con cui preserva il rientro nel ciclo cellulare è basato sulla repressione trascrizionale di E2F, come dimostrato dal fatto che in seguito alla delezione di Rb l'attività di questi fattori viene ripristinata. Tuttavia, come precedentemente argomentato, un ulteriore meccanismo, pRb indipendente previene l'alterazione dello stato postmitotico, bloccando i Mt Δ Rb in

corrispondenza della transizione G₁/S.

La riattivazione del ciclo cellulare nei miotubi, indotta sia da E1A che da ciclina D1/cdk4, promuove contemporaneamente la riduzione dell'espressione di marcatori del differenziamento muscolare quali, MyHC, MCK e MLC (Tiainen et al., 1996b; Latella et al., 2001). Il fatto che sia E1A che il complesso ciclina D1/cdk4, anche se con meccanismi diversi, inattivano pRb, porterebbe a concludere che pRb sia essenziale per l'espressione ottimale dei marcatori muscolari tardivi a differenziamento ultimato, così come lo è durante il suo raggiungimento. D'altra parte, E7, pur inducendo degradazione di pRb in miotubi TD, non altera il differenziamento, come dimostrato dal fatto che i livelli di MHC rimangono sostanzialmente invariati (Sacco et al., 2003). Esisteva quindi l'eventualità che pRb pur favorendo l'espressione delle proteine muscolari tardive durante le fasi finali del differenziamento, potesse divenire superflua a differenziamento ultimato. Questa possibilità è stata smentita dai dati di microarray, che hanno rilevato una sostanziale riduzione dell'espressione di varie proteine muscolo-specifiche (Tabella 3).

In figura 10 A è mostrato che la delezione di Rb non comportava incremento dei livelli di espressione della ciclina D1. Al contrario si assisteva alla ricostituzione sia dell'espressione (Fig. 10 A), sia dell'attività chinastica di entrambe le cicline E ed A (Fig. 11). Precedentemente era stato dimostrato, che il complesso chinastico ciclinaD1/cdk4, al contrario di ciclina E/cdk2, era in grado di riattivare la sintesi di DNA in miotubi TD (Latella et al., 2001). Avvalendoci di questa evidenza ci siamo chiesti se proprio l'assenza dell'attività chinastica associata a ciclina D1, fosse responsabile dell'accumulo dei MtΔRb in corrispondenza della transizione G₁/S. Per rispondere a questa domanda abbiamo espresso le proteine ciclina D1 e cdk4 nei MtΔRb. Nonostante gli adenovirus ricombinanti esprimenti le due proteine siano stati utilizzati a m.o.i. insufficienti a riattivare miotubi *wild-type* (Latella et al., 2001), i MtΔRb sintetizzavano efficientemente DNA (Fig. 13). Questa evidenza ci consente di concludere che il blocco pRb-indipendente che preserva lo stato postmitotico delle cellule muscolari è rimovibile ricostituendo nei miotubi ΔRb l'attività chinastica associata alla ciclina D1.

Era stato ipotizzato che p107, la cui espressione viene notevolmente incrementata nei mioblasti Rb^{-/-}, poteva almeno parzialmente sostituire pRb (Schneider et al., 1994). Analisi di Western blotting hanno confermato che i livelli proteici di p107 vengono prontamente innalzati in seguito alla delezione acuta di Rb in miotubi TD. Al contrario l'espressione dell'altra

proteina “*pocket*”, p130, rimaneva essenzialmente invariata (Fig. 14). Nonostante ciò, è noto che durante il processo differenziativo l’espressione di p130 aumenta e che sostituisce p107 nella formazione dei complessi con E2F-4. Nelle cellule muscolari TD, questi ultimi sono inoltre i più abbondanti tra quelli formati da E2F (Corbeil et al. 1995; Puri et al., 1998). Inoltre, poiché non solo pRb, ma tutte le proteine appartenenti a questa famiglia sono substrati di fosforilazione di ciclina D1/cdk4, era plausibile ipotizzare che il meccanismo di arresto del ciclo cellulare dei MtΔRb all’inizio della fase S, fosse sotto il controllo di p107 e/o p130. D'altra parte diverse evidenze suggerivano che entrambe, p107 e p130, non erano coinvolte nel meccanismo di preservazione dello stato postmitotico dei miotubi ΔRb. In primo luogo i topi p107^{-/-}:p130^{-/-} non mostrano alcun fenotipo muscolare (Cobrinik et al., 1996). In secondo luogo, la significativa riduzione dell’espressione di p107 nei MtΔRb, indotta dal trattamento con il siero (Schneider et al., 1994), non induce sintesi di DNA (dati non mostrati). In terzo luogo, l’espressione dell’oncogene E7 che presumibilmente inattiva tutte e tre le proteine “*pocket*”, non induce sintesi di DNA (Sacco et al., 2003). Infine, l’attività trascrizionale di E2F è completamente recuperata nei MtΔRb, il che dimostra che gli altri due componenti della famiglia, non possono rimpiazzare l’attività di repressione della trascrizione svolta da pRb (Fig. 8). Di fatto, il ruolo di p107 e p130 nel mantenimento dello stato postmitotico del muscolo scheletrico non è stato mai indagato in un sistema muscolare in cui l’espressione di pRb viene soppressa a differenziamento ultimato. Per verificare la veridicità delle argomentazioni avanzate, sono stati condotti esperimenti in mioblasti TKO, in cui l’espressione di pRb è stata ricostituita per il tempo necessario ad indurre il differenziamento terminale (Fig. 15). La successiva delezione di Rb ha consentito di ottenere miotubi TKO (Fig. 16 A). L’assenza di incorporazione di BrdU nei miotubi sia prima che dopo la delezione di Rb, dimostra sia che le cellule muscolari possono differenziare terminalmente in assenza di p107 e p130, sia che lo stato postmitotico viene preservato anche in una situazione di assenza di tutte le proteine “*pocket*” (Fig 16 B). Per concludere, i risultati mostrati in questo lavoro dimostrano l’esistenza insospettata nei miotubi TD, di un meccanismo indipendente da tutti i membri della famiglia di pRb, che proibisce l’ingresso in fase S. Queste evidenze indicano che lo stato postmitotico è preservato da un meccanismo diverso da quello con cui viene indotto. Una possibilità per spiegare questo apparente paradosso è che pRb, durante l’induzione del differenziamento,

interagendo con i complessi di rimodellamento della cromatina (Harbour and Dean, 2000a,b,c), stabilisca una volta e per sempre le proprietà dello stato postmitotico, divenendo superflua successivamente.

La scoperta che ciclina D1 e cdk4 possono sopprimere il nuovo meccanismo di inibizione dell'ingresso in fase S, è altrettanto importante. Evidenze genetiche indicano che il solo substrato critico dell'attività chinasi di ciclina D1 sia pRb (Lucas et al., 1995; Medema et al., 1995). Tuttavia sono stati recentemente identificati nuovi bersagli di tale attività (Matsuura et al., 2004) ed inoltre è stato dimostrato che la ciclina D1 è implicata in funzioni regolatorie che non coinvolgono le chinasi cdk (Cheng et al., 1998; Zwijsen et al., 1997). Di fatto non sappiamo se la rimozione del blocco alla sintesi del DNA pRb-indipendente richieda l'attività chinasi di cdk4. Entrambe queste ipotesi saranno oggetto di ulteriori indagini.

PROCEDURE SPERIMENTALI

ANTICORPI

Anticorpi utilizzati in IF: BrdU: clone Bu20a (Dako) o Alexa Fluor coniugato (Molecular Probes); Ciclina A: C-19 (Santa Cruz); PCNA: PC10 (Santa Cruz); MyHC: rabbit policlonal (gentilmente fornitoci da G. Cossu). Gli anticorpi secondari: Molecular Probes. I nuclei sono stati contromarcati con Hoechst 33258. Dove indicato, l'analisi di microscopia confocale è stata effettuata con TCS SP2 digital scanning instrument (Leica).

Anticorpi utilizzati in Western blotting: pRb: clone G3-245 (BD Pharmingen); p107: clone SD9 (Santa Cruz); p130: C-20 (Santa Cruz); ciclina D1: M-20 (Santa Cruz); ciclina A: C-19 (Santa Cruz); ciclina E: M-20 (Santa Cruz); PCNA: PC10 (Santa Cruz); MCM2: N-19 (Santa Cruz); RPA70: 2H10 (Neomarkers); HSP70: N27F3-4 (StressGene). Anticorpi secondari HRP- coniugati (Cappel); rivelazione: West Dura Kit (Pierce).

CELLULE E VIRUS

Le MSC sono state isolate dal muscolo femorale di topi neonati (7-10gg). Una volta prelevato e sminuzzato, è stato digerito con Hyaluronidase (35U/ml Sigma H-4272 Type N-S: from bovine testes) e Collagenase (50U/ml Sigma C-6885) in PBS1x a 37°C in agitazione per 15'. Il prodotto di questa prima digestione è stato ulteriormente digerito con Collagenase/Dispase (1 mg/ml Sigma C-3180) in PBS1x a 37°C in agitazione per 30'. Il prodotto è stato filtrato (Cell Strainer 70 µm nylon Falcon) e le MSC così ottenute sono state coltivate su collagene in DMEM supplementato con 20% FBS. Il differenziamento è stato indotto su piastre collagenate in DMEM contenente il 10% FBS, sostituito 12 ore dopo con DMEM supplementato con lo 0,5% HS. Dopo 72 ore, i miotubi sono stati infettati con AdCre o il virus di controllo alla m.o.i. 1000. Gli adenovirus esperimenti dl520, ciclina D1 e cdk4 (Latella et al., 2000), sono stati utilizzati alle m.o.i. 300, 40 e 500, rispettivamente. L'adenovirus Ad-Bcl-2, utilizzato alla m.o.i. 20, è stato costruito come descritto in (Latella et al. 2000) utilizzando il cDNA del gene umano Bcl-2. Quando non specificato, i miotubi sono stati trattati, 24 h dopo l'infezione, con 10% FBS (con 20 µM BrdU quando richiesto). Quando non specificato, le cellule sono state

fissate per IF, o raccolte per procedure biochimiche, 48 ore dopo l'infezione.

SAGGI DI ATTIVITÀ LUCIFERASICA

Le MSC sono state trasfettate con i costrutti *reporter* pGL3TATAbasic o con pGL3TATA6xE2F e selezionate in 2µg/ml puomicina. Le popolazioni policlonali stabilmente trasfettate sono state quindi infettate dopo il differenziamento come descritto nei risultati. L'attività luciferasica è stata misurata con Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega).

MICROARRAY

L'RNA messaggero totale è stato convertito in c-RNA e successivamente biotinilato utilizzando SuperScript II (Invitrogen) e Enzo (Affymetrix). Il cRNA è stato ibridato su *oligonucleotide microarrays* MGU74Av2 (Affymetrix). L'analisi dei dati è stata effettuata usando Affymetrix Microarray Suite v.5.0 e Microsoft Excel.

SAGGI CHINASICI

L'estrazione è stata effettuata incubando le cellule per 30' a 48°C in 500 µl di buffer di lisi (20 mM HEPES, pH 7.9, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.25% Nonidet P-40, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 0.5 mM sodium orthovanadate, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol [DTT], 2 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml aprotinin). Il lisato cellulare è stato brevemente sonicato, centrifugato, prepurificato per 2h con *protein G-agarose* (Santa Cruz Biotechnology), quindi incubato con gli anticorpi anti-ciclina E (M-20,) o con anti-ciclina (H-432) (Santa Cruz). Gli immunoprecipitati sono stati sottoposti a lavaggi, risospesi in 50 µl di buffer chinasi (50 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT) cui è stato aggiunto 1 mg di istone H1, 0,185 MBq di [γ -³²P]ATP e 50 µM ATP, e incubati per 30' a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata con 5x Laemmli buffer. Le proteine così marcate sono state risolte su gel di poliacrilamide contenete il 12,5% di SDS e rivelate mediante autoradiografia.

GENERAZIONE DI MIOTUBI TKO

Per esprimere una forma di pRb rimuovibile nelle MEF TKO, è stato inserito come descritto in (Berghella et al., 1999), un sito LoxP nel 3'LTR di pBabeBleo (Morgenstern and Land, 1990), ottenendo pBbxp. Un cDNA fuso ad HA (gentilmente fornitoci da P. Amati) è stato inserito nei siti EcoRI e Sall, ottenendo pBbxp/HA-Rb. I retrovirus corrispondenti, esprimenti Rb e di controllo, sono stati prodotti in cellule Phoenix e utilizzati per generare popolazioni policlonali di MEF TKO, selezionate con fleomicina. Queste cellule sono state infettate con un adenovirus ricombinante esprimente Myo D alla m.o.i 750 e indotte a differenziare in terreno *serum-free* (DMEM contenente 5µg/ml di insulina umana e 5µg/ml di olo-transferrina umana) per 72 h. I Miotubi sono stati superinfettati e sottoposti a saggio di incorporazione di BrdU, come descritto nei risultati.

REFERENZE

- Andrès V. and K. Walsh. 1996. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol.* 132:657-666
- Arnold H.H. and B. Winter. 1998. Muscle differentiation: more complexity to the network of muogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev.* 8:539-44
- Baldin V., J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano and G. Draetta. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev;* 7:812-821.
- Bergh G., M. Ehinger, I. Olsson, S.E. Jacobsen and U. Gullberg. 1999. Involvement of the retinoblastoma protein in monocytic and neutrophilic lineage commitment of human bone marrow progenitor cells. *Blood.* 94:1971-8.
- Berghella, L., L. De Angelis, M. Coletta, B. Berarducci, C. Sonnino, G. Salvatori, C. Anthonissen, R. Cooper, G.S. Butler-Browne, V. Mouly, G. Ferrari, F. Mavilio, and G. Cossu. 1999. Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of a retrovirally transferred oncogene. *Hum Gene Ther.*10:1607-1617.
- Bunz F., A. Dutriaux, C. Lengauer T. Waldman, S. Zhou, J.P. Brown, J.M. Sedivy, K.W. Kinzler and B. Vogelstein. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501.
- Chen P.L., D.J. Riley, Y. Chen and W.H. Lee. 1996a. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* 10:2794-804
- Chen P.L., D.J. Riley, S. Chen-Kiang and W.H. Lee. 1996. Retinoblastoma protein directly interacts with and activates the transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:456-9

Chen T.T. and Wang J.Y. 2000. Establishment of irreversible growth arrest in myogenic differentiation requires the RB LXCXE-binding function. *Mol Cell Biol.* 20:5571-80.

Cheng, M., V. Sexl, C.J. Sherr, and M.F. Roussel. 1998. Assembly of cyclin D dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1091-1096.

Clarke AR, E.R. Maandag, M. van Roon, N.M. van der Lugt, M. van der Valk, M.L. Hooper, A. Berns and H. te Riele. 1992. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359:328-30

Classon M., B.K. Kennedy, R. Mulloy and E.Harlow. 2000. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10826-31.

Cobrinik D. , M.H. Lee, G. Hannon, G. Mulligan, R.T. Bronson, N. Dyson, E. Harlow, D. Beach, R.A. Weinberg and T. Jacks. 1996. Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* 10:1633-44.

Coppola J.A., B.A. Lewis, and M.D. Cole. 1990. Increased retinoblastoma gene expression is associated with late stages of differentiation in many different cell types. *Oncogene.* 5:1731-1733.

Corbeil H.B., P. Whyte and P.E. Branton. 1995. Characterization of transcription factors E2F complexes during muscle and neuronal differentiation. *Oncogene* 11:909-920.

Crescenzi M., T.P. Fleming, A.B. Lassar, H. Weintraub and S.A. Aaronson. 1990. MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA;* 87:8442-8446.

Crescenzi M., S. soddu, A. Sacchi and F. Tatò. 1995a. Adenovirus infection induces reentry into the cell cycle of terminally differentiated skeletal muscle cells. *Ann N Y Acad Sci.* 752:9-18.

Crescenzi, M., S. Soddu, and F. Tato'. 1995b. Mitotic cycle reactivation in terminally differentiated cells by adenovirus infection. *J. Cell. Physiol.* 162:26-35.

Davis R.L., Weintraub H and Lassar A.B. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 51:987-1000.

Day K.C., M.T. McCabe, X. Zhao, Y. Wang, J.N. Davis, J. Phillips, M. Von Geldern, T. Ried, M.A. KuKuruga, G.R. Cunha, S.W. Hayward and M.L. Day. 2002. Rescue of embryonic epithelium reveals that the homozygous deletion of the retinoblastoma gene confers growth factor independence and immortality but does not influence epithelial differentiation or tissue morphogenesis. *J Biol Chem.* 277:44475-84.

Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12:2245-2262.

Eckner R., M. E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes J. A., De Caprio J. B. Lawrence and D. M. Livingston. 1994. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 130-KD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* 8:869-884.

Egan C., S. T. Bayley and P. E. Branton. 1989. Binding of the Rb1 protein to E1A product is required for adenovirus transformation. *Oncogene* 4:383-388.

Endo T and B. Nadal-Ginard Reversal of myogenic terminal differentiation by SV40 large T antigen results in mitosis and apoptosis. *J Cell Sci* 1998; 111(Pt 8):1081-1093.

Ewen M. E. Y., Xing J. B., Lawrence and Livingston D. M. 1991. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66: 1155-1164.

Farkas, T., K. Hansen, K. Holm, J. Lukas, and J. Bartek. 2002. Distinct phosphorylation events regulate p130- and p107-mediated repression of E2F-4. *J Biol Chem.* 277:26741-26752.

Fletcher O., D. Easton, K. Anderson, C. Gilham, M. Jay and J. Peto. 2004. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst.* 96:357-63.

Fogel M and Defendi V. Infection of muscle cultures from various species with oncogenic DNA viruses (SV40 and polyoma). *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58:967-973.

Friend S.H., R. Bernards, S. Rogelj, R.A. Weinberg, J.M. Rapaport, D.M. Albert and T.P. Dryja. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 323:643-6.

Geng Y., W. Whoriskey, M.Y. Park, R.T. Bronson, R.H. Medema, T. Li, R.A. Weinberg and P. Sicinski. 1999. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell.* 97:767-77.

Gery S., A.F. Gombart, Y.K. Fung and H.P. Koefler. 2004. C/EBPepsilon interacts with retinoblastoma and E2F1 during granulopoiesis. *Blood.* 103:828-35.

Gu W, J.W. Schneider, G. Condorelli, S. Kaushal, V. Mahdavi and B. Nadal-Ginard. 1993. Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* 72:309-324.

Harbour J.W., R.X. Luo, A. Dei Santi, A.A. Postino and D.C. Dean. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell.* 98:859-69.

Harbour J.W., D. C. Dean. 2000a. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14:2393-2409.

Harbour J.W., D. C. Dean. 2000b. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature Cell Biol.* 2:E65-E67.

Harbour J.W., D. C. Dean. 2000c. Chromatin remodelling and Rb activity. *Curr Opin Cell Biol.* 12:685-689.

Havely O., B.G. Novitch, D. B. Spicer, S. X. Shapek, J. Rhee, G. J. Hannon, D. Beach and A. B. Lassar. 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267:1018-1021

Hozak, P., D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1994. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Sci.* 107 :2191-2202.

Huang H.J., J.K. Yee, J.Y. Shew, P.L. Chen, R. Bookstein, T. Friedmann, E.Y. Lee and W.H. Lee. 1988. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science.* 242:1563-6.

Huh M.S., M.H. Parker, A. Scimè, R. Parks and M.A. Rudnicki. 2004. Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. *J.Cell Biol.* 166:865-876.

Ishida, S., E. Huang, H. Zuzan, R. Spang, G. Leone, M. West, and J.R. Nevins. 2001. Role for E2f in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol.* 21:4684-469

Jacks T., A. Fazeli, E.M. Schmitt, R.T. Bronson, M.A. Goodell and R.A. Weinberg. 1992. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359:295-300.

Jasmer DP. 1993. *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J Cell Biol.* 121(4):785-793.

Ji Y. and G.P. Studzinski. 2004. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res.* 64:370-7.

Knudsen E.S., C. Buckmaster, T.T. Chen, J.R. Feramisco and J.Y. Wang. 1998. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes Dev.* 12:2278-92.

Lassar A.B., S. X. Skapek and B. Novitch. 1994. Regulatory mechanism that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol.* 6: 788-7

Latella L., A. Sacchi and M. Crescenzi. 2000. Long-term fate of terminally differentiated skeletal muscle cells following E1A-initiated cell cycle reactivation. *Cell Death Differ*; 7(2):145-154.

Latella, L., A. Sacco, D. Pajalunga, M. Tiainen, D. Macera, M. D'Angelo, A. Felici, A.Sacchi, and M. Crescenzi. 2001. Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 21:5631-5643.

Lee WH, R. Bookstein, Hong F., L.J. Young, J.Y. Shew and E.Y. Lee. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235:1394-9.

Lee E.Y., C.Y. Chang, N. Hu, Y.C. Wang, C.C. Lai, K. Herrup, W.H. Lee and A.Bradley. 1992. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359:288-94

Leng, X., M. Noble, P.D. Adams, J. Qin, and J.W. Harper. 2002. Reversal of growth suppression by p107 via direct phosphorylation by cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4. *Mol Cell Biol.* 22:2242-2254.

Li Y., C. Graham, S. Lacy, A. M. Duncan and P. Whyte. 1993. The adenovirus E1A-associated 130 KD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclin A and E. *Genes dev.* 7:2366-2377.

Lipinski, M.M., and T. Jacks. 1999. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene.* 18:7873-7882.

Liu Y and R.N. Kitsis. 1996. Induction of DNA synthesis and apoptosis in cardiac myocytes by E1A oncoprotein. *J Cell Biol.* 133(2):325-334.

Loonstra, A., M. Vooijs, H.B. Beverloo, B.A. Allak, E. van Drunen, R. Kanaar, A. Berns, and J. Jonkers. 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:9209-9214.

Lowenheim, H., D.N. Furness, J. Kil, C. Zinn, K. Gultig, M.L. Fero, D. Frost, A.W. Gummer, J.M. Roberts, E.W. Rubel, C.M. Hackney, and H.P. Zenner. 1999. Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4084-4088.

Lukas, J., D. Parry, L. Aagaard, D.J. Mann, J. Bartkova, M. Strauss, G. Peters, and J. Bartek. 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*. 375:503-506.

Lukas J., T. Herzinger, K. Hansen, M.C. Moroni, D. Resnitzky, K. Helin, S.I. Reed and J. Bartek. 1997. Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes Dev*; 11:1479-1492.

Lukas C., C.S. Sorensen, E. Kramer, E. Santoni-Rugiu, C. Lindeneg, J.M. Peters, J. Bartek and J.Lukas. 1999. Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature*. 401:815-8.

Luo RX, Postigo AA and Dean DC. 1998. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*. 92:463-73.

Maandag E.C., M. van der Valk, M. Vlaar, C. Feltkamp, J. O'Brien, M. van Roon, N. van der Lugt, A. Berns and H. te Riele. 1994. Developmental rescue of an embryonic-lethal mutation in the retinoblastoma gene in chimeric mice. *EMBO J*. 13:4260-8.

MacMurray H.R.,Nguyen D., Westbrook T.F. and MacAnce D.J. 2001. Biology of human papillomaviruses. *Int. J. Exp. Pathol.*, 82:975-985.

MacPherson D., J. Sage, D. Crowley, A. Trumpp, R.T. Bronson and T.Jacks. 2003. Conditional mutation of Rb causes cell cycle defects without apoptosis in the central nervous system. *Mol Cell Biol*. 23:1044-53.

Mal, A., D. Chattopadhyay, M.K. Ghosh, R.Y. Poon, T. Hunter, and M.L. Harter. 2000. p21 and retinoblastoma protein control the absence of DNA replication in terminally differentiated muscle cells. *J Cell Biol.* 149:281-292.

Marino, S., M. Vooijs, H. van Der Gulden, J. Jonkers, and A. Berns. 2000. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* 14:994-1004.

Martelli F., C. Cenciarelli, G. Santarelli, B. Polikar, A. Felsani and M. Caruso. 1994 MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation. *Oncogene.* 9:3579-3590.

Martinez-Balbas M.A., U.M. Bauer, S.J. Nielsen, A. Brehm and T. Kouzarides. 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.* 19:662-71.

Matsuura I., N.G. Denissova, G. Wang, D. He, J. Long, and F. Liu. 2004. Cyclin dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature.*430:226-231.

Medema, R.H., R.E. Herrera, F. Lam, and R.A. Weinberg. 1995. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:6289-6293.

Montecucco, A., E. Savini, F. Weighardt, R. Rossi, G. Ciarrocchi, A. Villa, and G. Biamonti. 1995. The N-terminal domain of human DNA ligase I contains the nuclear localization signal and directs the enzyme to sites of DNA replication. *Embo J.* 14:5379-5386.

Morgenbesser S.D., B.O. Williams, T. Jacks and R.A. DePinho. 1994. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 371:72-4

Morgenstern, J.P., and H. Land. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucl. Acids Res.* 18:3587-3596.

Munger K., J.R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S.L. Gonzalez, M. Grace and V.L. Zacny. 2001. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20:7888-7898

Novitch, B.G., G.J. Mulligan, T. Jacks, and A.B. Lassar. 1996. Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J Cell Biol.* 135:441-456.

Novitch, B.G., D.B. Spicer, P.S. Kim, W.L. Cheung, and A.B. Lassar. 1999. pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr Biol.* 9:449-459.

Odelberg S.J., A. Kollhoff and M.T. Keating. 2000. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell.* 103:1099-109.

Pajalunga, D., D. Tognozzi, M. Tiainen, M. D'Angelo, F. Ferrantelli, K. Helin, A. Sacchi, and M. Crescenzi. 1999. E2F activates late-G1 events but cannot replace E1A in inducing S phase in terminally differentiated skeletal muscle cells. *Oncogene.* 18:5054-5062.

Pines A. and T. Hunter. 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346:760-763.

Pomerantz J., N. Schreiber-Agus, N.J. Liegeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlow, H.W. Lee, C. Cordon-Cardo and R.A. DePinho. 1998. The INK4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53.

Puri, P.L., L. Cimino, M. Fulco, C. Zimmerman, N.B. La Thangue, A. Giordano, A. Graessmann, and M. Levrero. 1998. Regulation of E2F4 mitogenic activity during terminal differentiation by its heterodimerization partners for nuclear translocation. *Cancer Res.* 58:1325-1331.

Robinson G.W., K.U. Wagner and L. Hennighausen. 2001. Functional mammary gland development and oncogene-induced tumor formation are not affected by the absence of the retinoblastoma gene. *Oncogene.*

20:7115-9.

Ruiz, S., M. Santos, C. Segrelles, H. Leis, J.L. Jorcano, A. Berns, J.M. Paramio, and M. Vooijs. 2004. Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development*.131:2737-2748.

Sacco, A., F. Siepi, and M. Crescenzi. 2003. HPV E7 expression in skeletal muscle cells distinguishes initiation of the postmitotic state from its maintenance. *Oncogene*. 22:4027-4034.

Sage, J., G.J. Mulligan, L.D. Attardi, A. Miller, S. Chen, B. Williams, E. Theodorou, and T. Jacks. 2000. Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev*. 14:3037-3050.

Sage, J., A.L. Miller, P.A. Perez-Mancera, J.M. Wysocki, and T. Jacks. 2003. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*. 424:223-228.

Sherr C.J. and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 13:1501-12.

Schneider, J.W., W. Gu, L. Zhu, V. Mahdavi, and B. Nadal-Ginard. 1994. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb^{-/-} muscle cells. *Science*. 264:1467-1471.

Shin E.K., A. Shin, C. Paulding, B. Schaffhausen and A.S. Yee. 1995. Multiple changes in E2F function and regulation occur upon muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol*.4:15-18.

Skapek SS, Rhee J, Spicer DB and A.B. Lassar. 1995. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science*; 267:1022-1024.

Thomas D.M., S.A. Carty, D.M. Piscopo, J.S. Lee, W.F. Wang, W.C. Forrester and P.W.Hinds. 2001. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell*. 8:303-16.

Tiainen, M., D. Pajalunga, F. Ferrantelli, S. Soddu, G. Salvatori, A. Sacchi, and M. Crescenzi. 1996a. Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined in G₀, but can enter G₁ upon growth factor stimulation. *Cell Growth Diff.* 7:1039-1050.

Tiainen M., D. Spitkovsky, P. Jansen-Dürr, A. Sacchi, and M. Crescenzi. 1996b. Expression of E1A in terminally differentiated muscle cells reactivates the cell cycle and suppresses tissue-specific genes by separable mechanisms. *Mol Cell Biol.* 16(10):5302-5312.

Trouche D., A. Cook and T. Kouzarides. 1996. The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res.* 24:4139-45.

Tsai L. H., E. Harlow and M. Myerson. 1991. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A-and adenovirus E1A- associated p33 kinase. *Nature* 353:174-177.

Walsh K. and H. Perlman. 1997. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 7:597-602.

Walsh K. 1997. Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Prog Cell Cycle Res.* 3:35-8.

Wang J., K. Guo, K.N. Wills and K. Walsh. 1997. Rb function to inhibit apoptosis during myocyte differentiation. *Cancer Res.* 57:351-354

Webster K.A., G.E. Muscat, L. Kedes. 1988. Adenovirus E1A products suppress myogenic differentiation and inhibit transcription from muscle-specific promoters. *Nature* 332:553-557.

Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.

Williams B.O., E.M. Schmitt, L. Remington, R.T. Bronson, D.M. Albert, R.A. Weinberg and T. Jacks. 1994. Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences. *EMBO J.* 13:4251-9.

Wu L., A. de Bruin, H.I. Saavedra, M. Starovic, A. Trimboli, Y. Yang, J. Opavska, P. Wilson, J.C. Thompson, M.C. Ostrowski, T.J. Rosol, L.A. Woollett, M. Weinstein, J.C. Cross, M.L. Robinson and G. Leone. 2003. Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. *Nature* 421: 942-7.

Xiao, Z.-X., D. Ginsberg, M. Ewen, and D.M. Livingston. 1996. Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4633-4637.

Xiao B., J. Spencer, A. Clements, N. Ali-Khan, S. Mittnacht, C. Broceno, M. Burghammer, A. Perrakis, R. Marmorstein and S.J. Gamblin. 2003. Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2363-8.

Yaffe D. and D. Gershon. 1967. Multinucleated muscle fibres: induction of DNA synthesis and mitosis by polyoma virus infection. *Nature*; 215:421-424.

Zacksenhaus, E., Z. Jiang, D. Chung, J.D. Marth, R.A. Phillips, and B.L. Gallie. 1996. pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. *Genes Dev.* 10:3051-3064.

Zhang Y., Y. Xiong and W.G. Yarbrough. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell.* 92:725-34.

Zhang H.S., A.A. Postigo and D.C. Dean. 1999. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell.* 97:53-61.

Zhang H. S. M.Gavin, A. Dahiya, A. A. Postigo, D. Ma, Robin X. Luo, J. W. Harbour and D. C. Dean. 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell.* 101:79-89

Zwijzen, R.M., E. Wientjens, R. Klompaker, J. van der Sman, R. Bernards, and R.J. Michalides. 1997. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*. 88:405-415.

Curriculum Vitae et Studiorum

Nome: Francesca Siepi
Nata a : Roma il 09/06/1971
Cittadinanza: Italiana
Residenza: Via G. Scalia, 51, 00136 Roma
Indirizzo e-mail: siepi@bce.uniroma1.it
Recapiti telefonici: abit. 0639721668
cell: 3382900163

TITOLI DI STUDIO

20/07/1990 Consegue la Maturità scientifica il presso il Liceo Scientifico di Roma "Taletè".

13/07/1999 Si laurea in Scienze Biologiche, indirizzo **Biotechnologico**, presso l'Università "La Sapienza" di Roma con il voto di **110/110 cum laude**

2001 Vince un dottorato di ricerca della durata di quattro anni in "Biochimica e Biologia Molecolare" presso la Facoltà di Medicina dell'Università di "Tor Vergata" di Roma.

2003: Consegue l'Abilitazione all'Esercizio della Professione di **Biologo**

LINGUE STRANIERE

Inglese
Francese

ESPERIENZA PROFESSIONALE E LAVORATIVA

1997-1999 **Studente in tesi** presso il laboratorio del **Prof. F. Fantoni**, dipartimento di **Biotechnologie Cellulari ed Ematologia, V Clinica Medica, Policlinico “Umberto I”**.

1999-2000 **Tirocinante** presso il laboratorio del **Dott. M. Crescenzi**, **Istituto Superiore di Sanità**.

2000-2002 **Collaborazione coordinata e continuativa** con **Istituto Superiore di Sanità** presso il laboratorio del **Dott. M. Crescenzi**.

01-12/2003 **Borsista M.U.R.S.T** presso il laboratorio del **Prof. M. Tripodi** -Dipartimento di Biotechnologie Cellulari ed Ematologia-, V Clinica Medica, **Policlinico “Umberto I”**.

01-06/2004: **Collaborazione coordinata e continuativa** con **Istituto Nazionale Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” di Roma** presso il laboratorio di **Espressione Genica** del **Prof. M. Tripodi**.

07/2004 ad oggi: **Borsista con il profilo di “Dirigente Sanitario”** presso il laboratorio di **“Espressione Genica”** **Istituto Nazionale Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani”**.

BORSE DI STUDIO

gennaio- dicembre 2003 **Borsa di studio MURST** della durata di 12 mesi svolta presso il Dipartimento di Biotechnologie Cellulari ed Ematologia, V Clinica Medica, **Policlinico “Umberto I”**.

2004 **Borsa di studio** con il profilo di **“Dirigente Sanitario”** della durata di 12 mesi, estendibile a 24, erogata dall'**Istituto Nazionale Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani”** di Roma.

PROFILO PROFESSIONALE

1997-1999 Ospite del laboratorio del **Prof. F. Fantoni** del Dipartimento di Ematologia e Biotecnologie Cellulari del Policlinico "Umberto I" di Roma per la **preparazione della tesi di laurea sperimentale**. Partecipa alla caratterizzazione di un modello murino transgenico per i recettori umani CD4 e CXCR4, sensibile all'infezione di HIV-1. Prende parte ad esperimenti preliminari volti a verificare l'infettabilità dei linfociti derivanti dalla milza di topi doppi transgenici CD4-CXCR4 con HIV-1. Con lo scopo di migliorare la replicazione del virus dell'immunodeficienza umana nelle cellule murine, produce un virus HIV-1 ricombinante, Rev-indipendente; interviene in esperimenti volti a valutare il vantaggio replicativo di questo virus, rispetto al tipo selvatico, in linfociti murini esprimenti i recettori umani CD4 e CXCR4.

1999 Consegue il diploma di laurea in Scienze Biologiche con la votazione **110/110 cum laude** discutendo la tesi sperimentale dal titolo "**I recettori umani CD4 e CXCR4 mediano l'ingresso di HIV-1 nelle cellule murine**".

1999-2000 E' inserita, come **tirocinante**, presso l'**Istituto Superiore di Sanità**, in un programma di ricerca coordinato dal **Dott. Marco Crescenzi**. volto a definire "**le basi molecolari della riattivazione forzata del ciclo cellulare in cellule muscolari terminalmente differenziate (miotubi)**". Nell'ambito di questo progetto partecipa a definire gli **effetti dell'espressione dell'oncogene E7 sull'induzione del differenziamento terminale e sul mantenimento dello stato postmitotico in cellule muscolari terminalmente differenziate**.

2000-2002 Come ricercatore a contratto continua a svolgere attività di ricerca presso l'**Istituto Superiore di Sanità**, nel laboratorio del **Dott. M. Crescenzi**. Nell'ambito del progetto di ricerca volto a definire "**le basi molecolari della riattivazione forzata del ciclo cellulare in cellule muscolari terminalmente differenziate**", si occupa di definire il **ruolo della proteina del retinoblastoma (pRb) nel mantenimento dello stato post-mitotico muscolare**.

Da gennaio 2003 a oggi Presso il laboratorio del **Prof. Marco Tripodi**, Istituto Nazionale Malattie Infettive "L. Spallanzani". Il progetto di ricerca

è volto alla caratterizzazione *in vivo* e *in vitro* di precursori epatocitari murini (palmate), isolati da fegato di embrioni di topi transgenici per il recettore Met. Le palmate sono precursori bipotenti, in grado di differenziare sia in epatociti che in colangiociti. Utilizzando *phage display* si sta occupando di isolare anticorpi che riconoscano selettivamente i precursori, e non le cellule differenziate. Questi anticorpi verranno utilizzati per l'identificazione dei precursori epatocitari murini nei diversi stadi di sviluppo epatico embrionale ed eventualmente nell'adulto.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

30 settembre

4 ottobre 2000 Partecipazione al II Convegno FISV tenutosi a Riva del Garda dal 30 settembre al 4 ottobre 2000 con il poster dal titolo: “*Ruolo di Retinoblastoma nel mantenimento del differenziamento terminale del muscolo scheletrico*”. **F. Siepi**, D. Pajalunga e Marco Crescenzi.

21-25 settembre 2001 Partecipazione al III Convegno FISV tenutosi a Riva del Garda dal 21 al 25 settembre 2001 con il poster dal titolo “*Ruolo di Retinoblastoma nel mantenimento del differenziamento terminale del muscolo scheletrico*”. **F. Siepi**, D. Pajalunga e Marco Crescenzi.

5-7 aprile 2001 Partecipazione al convegno SIBBM 2001 svoltosi a Cortona dal 5 al 7 aprile 2001, Gruppo di Studio “Struttura e Funzione del Genoma” con la presentazione orale dal titolo: “La proteina del retinoblastoma è essenziale all'induzione, ma non al mantenimento del differenziamento terminale del muscolo scheletrico

ATTESTATI DI PARTECIPAZIONE A CORSI

Corso Teorico-Pratico per il personale che opera con animali di laboratorio organizzato dal **Servizio Qualità e Sicurezza della Sperimentazione Animale** svolto presso l'Istituto Superiore di Sanità il 27 marzo e il 15 maggio 2001.

Corso di formazione sulla sicurezza per il personale che opera nei laboratori dell'ISS a rischio chimico, fisico e biologico organizzato dal

Servizio di Prevenzione e Sicurezza dell'Istituto Superiore di Sanità i
giorni 4 e 5 giugno 2001.

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI DEL CANDIDATO

1) “ HPV E7 expression in skeletal muscle cells distinguishes initiation of the postmitotic state from its maintenance”

Sacco, **F. Siepi** and M. Crescenzi, *Oncogene*. 2003 Jun 26;22(26):4027-34.

2) “A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells”

Grazia Camarda*, **Francesca Siepi***, Deborah Pajalunga, Camilla Bernardini, Rossella Rossi, Alessandra Montecucco, Ettore Meccia, and Marco Crescenzi.

(in press on J Cell Biol.) ***these two authors contributed equally to this work.**

***COPIA DELLE PUBBLICAZIONI DEL CANDIDATO RILEVANTI AI
FINI DELLA TESI***