

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie

Ciclo XXV

**PI3Ky modula la contrazione della muscolatura
liscia delle vie aeree, attraverso l'interazione
con PDE4B**

Coordinatore:

Prof. Nelson Marmiroli

Tutor:

Dott. Fabrizio Facchinetti

Dottoranda:

Serena Bertolini

Sommario

Riassunto	3
Introduzione	6
Le fosfoinositide 3-chinasi di classe I	7
La funzione enzimatica di PI3K γ	11
La funzione <i>scaffold</i> di PI3K γ nella regolazione della contrattilità	14
Il <i>signaling</i> dei β_2 -ARs nella contrazione della muscolatura liscia	14
Il ruolo di PI3K γ nel <i>signaling</i> del cAMP	18
Scopo della tesi	21
Materiali e metodi	24
Risultati	35
Il tessuto muscolare liscio della trachea esprime PI3K γ	36
PI3K γ regola la contrazione del muscolo liscio della trachea in modo indipendente dalla sua attività chinasi	38
PI3K γ si associa con PDE4B e ne regola l'attività enzimatica	40
PI3K γ regola PDE4B ma non PDE3A in cellule muscolari lisce della trachea murina	42
PI3K γ aumenta l'attività catalitica di PDE4B in cellule HEK293 trasfettate	44
PI3K γ modula i livelli di cAMP in cellule muscolari lisce della trachea umana	46
PI3K γ si associa con PKA e PDE4B in cellule muscolari lisce della trachea umana	49
Discussione	51
Bibliografia	57

Riassunto

Le fosfoinositide 3-chinasi di classe I sono chinasi lipidiche che controllano numerosi processi cellulari, attraverso la sintesi di fosfatidilinositolo-3, 4, 5-trifosfato (PIP₃). In base al loro meccanismo di attivazione le PI3K di classe I vengono divise in due sottogruppi: la classe IA con le isoforme PI3K α , β e δ viene attivata a valle di recettori tirosina chinasi (RTKs); la classe IB con la sola isoforma PI3K γ viene attivata a valle di recettori accoppiati a proteine G (GPCRs).

Dalla sua iniziale scoperta, si è ritenuto che PI3K γ fosse prevalentemente espressa in cellule immunocompetenti. In macrofagi, neutrofili e linfociti questa proteina svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della migrazione al sito di infiammazione e la sua attività catalitica è stata molto studiata in relazione a patologie infiammatorie croniche, come artrite reumatoide e psoriasi. Accanto all'attività di chinasi lipidica e proteica, PI3K γ può agire anche come una proteina *scaffold* nella regolazione dell'omeostasi dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) a valle dei recettori β -adrenergici (β -ARs).

Il cAMP è un messaggero secondario sintetizzato dall'adenilato ciclasi (AC) a valle di recettori GPCRs e degradato dalle fosfodiesterasi (PDE). Il target principale del cAMP è la proteina chinasi A (PKA), una chinasi serina/treonina coinvolta in numerosi processi cellulari, tra cui la regolazione della contrattilità. Il rilassamento del muscolo liscio è modulato dal *pathway* β_2 -ARs/cAMP/PKA, in cui il legame di catecolamine come adrenalina e noradrenalina al recettore β_2 -ARs promuove l'attività dell'adenilato ciclasi, aumentando di conseguenza i livelli intracellulari di cAMP in specifici compartimenti. Successivamente, PKA attivata dall'aumento di cAMP fosforila e inibisce un vasto numero di proteine coinvolte nella contrazione muscolare. Allo stesso tempo, PKA fosforila ed aumenta l'attività delle PDE, che attraverso la degradazione di cAMP mediano il *feedback* negativo di questa via di segnalazione.

Studi recenti hanno dimostrato che nel miocardio PI3K γ si comporta come un regolatore negativo del *signaling* a valle dei recettori β_2 -ARs. Nel muscolo cardiaco PI3K γ recluta PKA attraverso una regione situata all'N-terminale. La formazione di questo complesso è indispensabile per promuovere l'attivazione di diverse fosfodiesterasi e per regolare i livelli di cAMP nel cardiomiocita.

Se da una parte il ruolo di PI3K γ nella regolazione della contrazione del miocardio è stato ben caratterizzato, il coinvolgimento di questa proteina nel *signaling* β_2 -ARs/cAMP/PKA e la sua importanza nella regolazione dei livelli di cAMP nella muscolatura liscia devono ancora essere dimostrati.

In questo studio, è stata confrontata la contrattilità al carbacolo di trachee murine prelevate da animali PI3K γ *wild-type*, PI3K γ *knock-out* o esprimenti una forma di PI3K γ priva dell'attività catalitica (*kinase-dead*). La contrattilità ridotta delle trachee PI3K γ *knock-out* rispetto a quelle *wild-type* e *kinase-dead* dimostra che PI3K γ è in grado di modulare la contrazione del muscolo liscio della trachea in seguito a stimolazione colinergica, in modo indipendente dalla sua attività chinasi. Esperimenti di attività enzimatica effettuati su cellule muscolari lisce ottenute da trachee murine *wild-type*, *kinase-dead* e *knock-out* per PI3K γ hanno dimostrato che la ridotta contrazione osservata nelle trachee di animali *knock-out* è causata da una minore attività catalitica della fosfodiesterasi PDE4B. L'iper-espressione di PI3K γ e di PDE4B in cellule HEK293T ha permesso di dimostrare che queste proteine sono in grado di associarsi in un complesso. Inoltre è stato osservato un aumento dell'attività enzimatica di PDE4B quando essa è co-espressa con PI3K γ . L'utilizzo di sonde FRET ha permesso di misurare un maggiore accumulo di cAMP in seguito a stimolazione dei recettori β_2 -ARs in cellule muscolari lisce della trachea umana (ASMC) in cui PI3K γ è stata silenziata. Ciò dimostra che l'idrolisi del cAMP da parte di PDE4B è ridotta in assenza di PI3K γ . Utilizzando la tecnica della co-immunoprecipitazione è stato osservato che in ASMC PI3K γ forma un complesso proteico con PKA e PDE4B.

In conclusione, l'interazione tra PI3K γ , PKA e PDE4B nelle cellule della muscolatura liscia respiratoria delle vie aeree aumenta l'attività della fosfodiesterasi, favorendo la degradazione di cAMP e lo spegnimento della via di segnalazione a valle dei recettori β_2 -ARs. Tale meccanismo ha un ruolo funzionale rilevante nel regolare la contrattilità della muscolatura liscia delle alte vie aeree.

Introduzione

Le fosfoinositide 3-chinasi di classe I

Le fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) appartengono ad una vasta famiglia di chinasi lipidiche che catalizzano l'aggiunta di un gruppo fosfato sull'idrossile in posizione D3 presente sull'anello dell'inositolo, generando fosfatidilinositoli (PtdIns). Le PI3K sono enzimi molto conservati e presenti in tutti gli eucarioti, dal lievito ai mammiferi superiori. Esse sono suddivise in classe I, II e III, sulla base della loro struttura molecolare, della regolazione cellulare e della selettività di substrato (Cantley, *Science*, 2002; Hawkins et al., *Biochem Soc Trans*, 2006). Le PI3K di classe I, che comprende la classe IA (PI3K α , PI3K β e PI3K δ) e la classe IB (PI3K γ), sono una famiglia di chinasi che fosforilano sia lipidi che proteine e che controllano numerose funzioni cellulari, come crescita e proliferazione, sopravvivenza e apoptosi, adesione e migrazione (Fig. 1). Questa classe di enzimi catalizza la fosforilazione del fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂; PIP₂), generando il messaggero secondario fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃; PIP₃). Le PI3K di classe I sono eterodimeri costituiti da una subunità catalitica di 110kDa e una subunità regolatoria che ne controlla espressione, attivazione e localizzazione subcellulare (Brachmann et al., *Mol Cell Biol*, 2005; Elis et al., *Biol Chem*, 2006). Le subunità catalitiche p110 hanno una sostanziale omologia di sequenza e studi recenti sulla loro struttura tridimensionale mostrano un'elevata conservazione di alcuni elementi strutturali (Walker et al., *Nature*, 1999; Williams et al., *Biochem Soc Trans*, 2009). Infatti, tutte le subunità p110 contengono un dominio di legame all'adattatore (ABD), un dominio di legame a Ras (RBD), un dominio C2 di legame ai fosfolipidi, un dominio ad elica (noto anche come dominio PIK) e un dominio catalitico bilobato. Le subunità catalitiche della classe IA (PI3K α , PI3K β e PI3K δ) formano eterodimeri con la famiglia di subunità regolatorie p85. Poiché p85 contiene due domini SH2 che legano in modo specifico residui di fosfotirosina, generalmente le PI3K di classe IA vengono attivate a valle di recettori tirosina chinasi (RTK), in seguito al legame di fattori di crescita e citochine alla porzione extracellulare del recettore. Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato la capacità di PI3K β di agire a valle di

recettori accoppiati a proteine G (GPCR) (Ciraolo et al., *Sci Signal*, 2008; Guillermet-Guibert et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008). Ad eccezione di PI3K δ , che è espressa principalmente nei leucociti, l'espressione delle PI3K di classe IA è ubiquitaria.

La subunità catalitica p110 γ si associa con le subunità regolatorie p101 e p84/87 (nota anche come p87PIKAP) (Voigt et al., *J Biol Chem*, 2006; Stephens et al., *Cell*, 1997; Suire et al., *Curr Biol*, 2005). Essa viene attivata a valle di recettori accoppiati a proteine G (GPCR), come i recettori delle chemochine. Questa attivazione è mediata dal reclutamento di PI3K γ a livello della membrana plasmatica, dove interagisce sia con la subunità $\beta\gamma$ della proteina G attivata a valle del recettore, sia con RAS presente nella forma attiva legata al GTP (Stephens et al., *Cell*, 1997; Pacold et al., *Cell*, 2000). Analogamente a PI3K δ , anche PI3K γ è espressa ad alti livelli nei leucociti, ma piccole quantità di questo enzima sono presenti anche nell'endotelio (Vecchione et al., *J Exp Med*, 2005), nel tessuto cardiaco (Patrucco et al., *Cell*, 2004) e nella muscolatura liscia (Vecchione et al., *J Exp Med*, 2005).

Le PI3K di classe I sono responsabili della sintesi di PIP₃ in seguito all'attivazione di specifici recettori. Questo fosfolipide, che è sostanzialmente assente nella cellula in condizioni basali, agisce come messaggero secondario, inducendo una vasta gamma di risposte biologiche mediate dall'attivazione delle PI3K. Infatti, il PIP₃ agisce come sito di *docking* per diverse proteine che contengono uno specifico motivo strutturale chiamato dominio di omologia alla plecstrina (dominio PH) (Lemmon and Ferguson, *Biochem J*, 2000). Questa famiglia di proteine contenenti il dominio PH comprende numerose chinasi e attivatori/inibitori di piccole GTPasi. La via di segnalazione a valle della sintesi di PIP₃ meglio caratterizzata prevede la fosforilazione della chinasi serina/treonina Akt. Grazie al suo dominio PH, Akt viene reclutata sulla membrana plasmatica, dove subisce un cambiamento conformazionale che permette la fosforilazione della treonina308 (Thr308) da parte di PDK1 e della serina473 (Ser473) da parte di mTORC2. Questi eventi attivano Akt che, attraverso la fosforilazione di numerosi *targets*, regola metabolismo cellulare, sintesi proteica, sopravvivenza, proliferazione, migrazione e adesione (Manning and Cantley, *Cell*, 2007).

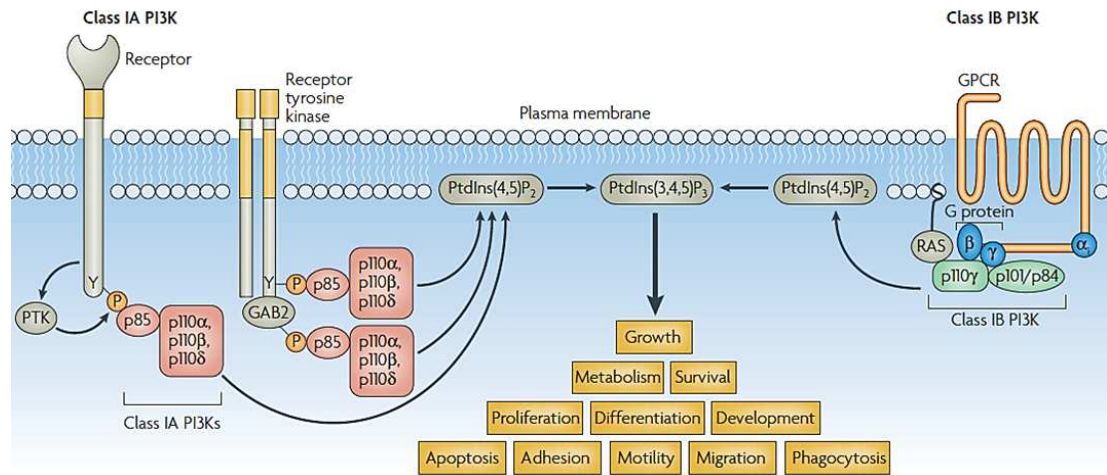


Figura 1: Rappresentazione schematica del *pathway* delle PI3K di classe I. In seguito a stimolazione, tutte le fosfoinositide 3-chinasi di classe I vengono reclutate a livello della membrana plasmatica, dove generano fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) attraverso la fosforilazione di fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂). Le PI3K di classe IA (p110α, p110β e p110δ) legano in modo diretto o indiretto recettori tirosina-chinasi (RTKs) attraverso l'interazione della loro subunità regolatoria (p85) con i residui di fosfo-tirosina presenti sulle porzioni citoplasmatiche dei recettori o su proteine adattatrici, come GAB2 (GRB2-associated binding protein 2). L'unica PI3K di classe IB, PI3Kγ, viene reclutata a valle di recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) mediante interazione diretta con la subunità βγ della proteina G. Anche la piccola GTPasi RAS, nella sua forma attiva legata al GTP, interagisce direttamente con la subunità catalitica p110γ, regolando ulteriormente la sua attività. L'attivazione di tutte le PI3K di classe I determina la formazione del messaggero lipidico PtdIns(3,4,5)P₃ sulla membrana plasmatica, che agisce come un sito di *docking* per proteine che contengono domini di omologia alla plestrina (come Akt). Ciò attiva una cascata di eventi di fosforilazione e di interazioni proteina-proteina che controlla numerosi processi cellulari. PTK: protein tyrosine kinase (Rommel et al., *Nat Rev Immunol*, 2007).

La segnalazione mediata dalle PI3K di classe I viene regolata negativamente dall'azione di due fosfatasi che rimuovono un gruppo fosfato sull'inositolo presente nei fosfoinositidi: PTEN e SHIP.

PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10*) è un regolatore negativo di importanti funzioni cellulari come crescita e sopravvivenza (Leslie et al., *Biochem J*, 2004; Stiles, *Int J Biochem Cell Biol*, 2009). Questo enzima contrasta l'azione delle PI3K attraverso la defosforilazione di $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. PTEN è espresso in modo ubiquitario e costitutivo ed è stato molto studiato in relazione all'insorgenza di tumori. Infatti, molti studi hanno individuato PTEN come il secondo gene più comunemente deletato nei tumori umani, dopo p53. Una ragione dell'importanza di PTEN nella segnalazione intracellulare è la sua mancanza di ridondanza funzionale. Nonostante siano state individuate altre fosfatasi per il PIP_3 , non esistono omologhi di PTEN largamente espressi e nella maggior parte dei tipi cellulari i livelli di PIP_3 , sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione, dipendono strettamente dall'attività di PTEN (Sun et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999).

Il PIP_3 può essere substrato anche della famiglia di fosfatasi SHIP (*SH2 domain-containing inositol phosphatase*), che rimuovendo il gruppo fosfato in posizione D5 determina la sintesi di $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$. In seguito a stimolazione, SHIP viene reclutata sulla membrana cellulare grazie all'interazione con le code citoplasmatiche di diversi recettori, come ad esempio la sequenza ITIM fosforilata dei recettori $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ nelle cellule B (Tridandapani et al., *Mol Cell Biol*, 1997). Una volta che SHIP è localizzata al sito di attivazione, la sua attività 5'-fosfatasica idrolizza il PIP_3 e previene il reclutamento in membrana di proteine contenenti il dominio PH, come Akt e $\text{PLC}\gamma$. L'analisi di topi *knock-out* per SHIP ha permesso di comprendere l'importanza di questa fosfatasi per lo sviluppo e l'attivazione delle cellule della linea linfoide e mieloide (Helgason et al., *Genes Dev*, 1998).

La funzione enzimatica di PI3K γ

Lo studio del fenotipo di topi PI3K γ *knock-out* o esprimenti una forma di PI3K γ priva dell'attività catalitica (*kinase-dead*) ha evidenziato il ruolo primario di questo enzima nella risposta immunitaria innata e adattativa. In particolare, PI3K γ agisce come un sensore di chemochine coinvolto nella regolazione della migrazione dei leucociti.

I topi *knock-out* per PI3K γ non hanno alcuna evidente disfunzione e sono vitali e fertili. Tuttavia, essi mostrano delle risposte anomale quando il loro sistema immunitario è sottoposto a stress.

Il ruolo di PI3K γ nella migrazione dei leucociti, in particolare neutrofili e macrofagi, al sito d'infiammazione è stato riportato da molti gruppi di ricerca. È stato dimostrato che la chemiotassi dei neutrofili indotta da una vasta gamma di fattori, come fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina), il frammento del complemento C5a, interleuchina-8 (IL8/CXCL8), leucotriene B4 (LTB4) e MIP1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*), è dipendente da PI3K γ e che questa risposta è ridotta in neutrofili derivati da topi PI3K γ *knock-out* (Hirsch et al., *Science*, 2000; Sasaki et al., *Science*, 2000; Suire et al., *Nat Cell Biol*, 2006; Ferguson et al., *Nat Cell Biol*, 2007). Queste cellule presentano difetti nella chemiocinesi, nell'adesione e nella polimerizzazione dell'actina filamentosa (actina F) in seguito a stimolazione con fMLP, dimostrando che PI3K γ regola diversi meccanismi coinvolti nella migrazione cellulare (Ferguson et al., *Nat Cell Biol*, 2007). La chemiotassi dei neutrofili umani verso un gradiente di fMLP viene ridotta in modo concentrazione dipendente anche dal trattamento con AS252424, un inibitore di PI3K γ (Ferguson et al., *Nat Cell Biol*, 2007).

Analogamente ai neutrofili, anche i macrofagi hanno bisogno dell'attività di PI3K γ per migrare verso fattori chemiotattici. Macrofagi ottenuti da topi *knock-out* per PI3K γ mostrano un difetto nella chemiotassi verso un pannello di mediatori dell'infiammazione, che comprendono SDF-1 (*stromal-derived factor-1*), MDC (*macrophage-derived chemokine*), MIP-5 (*macrophage inflammatory protein-5*), MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) e C5a (*complement*

componen 5A) (Hirsch et al., *Science*, 2000; Jones et al., *Exp Cell Res*, 2003). Inoltre, macrofagi umani e murini trattati con l'inibitore di PI3Kγ AS252424 mostrano una marcata riduzione della chemiotassi verso MCP-1 (Pomel et al., *J Med Chem*, 2006).

Analogamente a quanto riscontrato negli esperimenti condotti sulle cellule, il reclutamento di macrofagi e neutrofili al sito d'infiammazione è ridotto anche *in vivo*. La peritonite indotta da infezioni microbiche causa una massiccia infiltrazione di neutrofili e macrofagi, che risulta ridotta in modo significativo in topi PI3Kγ *knock-out*, come dimostrato dall'infezione con *Listeria* ed *E. coli* (Sasaki et al., *Science*, 2000; Hirsch et al., *Science*, 2000).

Il ruolo di PI3Kγ nella migrazione cellulare è stato dimostrato anche in modelli d'infiammazione polmonare (Takeda et al., *J Allergy Clin Immunol*, 2009; Lim et al., *Am J Physiol Lung Mol Cell Physiol*, 2009), di artrite reumatoide (Camps et al., *Nat Med*, 2005) e di colite indotta da somministrazione orale di destrano sodio solfato (DSS) (Van Dop et al., *Immunol Lett*, 2010).

Insieme alla risposta chemiotattica, i neutrofili sono responsabili del *burst* ossidativo, che determina la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in risposta a fattori pro-infiammatori e chemiotattici. Topi *knock-out* per PI3Kγ mostrano una ridotta produzione di anione superossido (O₂⁻) in seguito a stimolazione con fMLP o C5a (Hirsch et al., *Science*, 2000; Sasaki et al., *Science*, 2000; Condliffe et al., *Blood*, 2005).

E' stato dimostrato che PI3Kγ ha un ruolo importante anche nella degranulazione dei mastociti e nell'amplificazione della risposta immunitaria mediata da questo tipo cellulare (Laffargue et al., *Immunity*, 2002; Bohnacker et al., *Sci Signal*, 2009). Infatti, mastociti derivati dal midollo osseo di topi PI3Kγ *knock-out* mostrano una ridotta capacità di degranulare in seguito a stimolazione con un antigene e in esperimenti *in vivo* gli animali *knock-out* sono protetti dall'anafilassi indotta da iniezione di IgE ed allergene (Laffargue et al., *Immunity*, 2002).

L'assenza di PI3Kγ ha delle importanti ripercussioni anche sulla risposta immunitaria adattativa. Ad esempio, PI3Kγ regola la motilità delle cellule dendritiche (DC), una popolazione di leucociti che, attraverso il meccanismo di presentazione dell'antigene, controlla l'attivazione dei linfociti T e B. Cellule

dendritiche immature o stimulate con $\text{TNF}\alpha$, ottenute da topi PI3K γ *knock-out*, mostrano una ridotta capacità di migrare *in vitro* in risposta a varie chemochine (Del Prete et al., *EMBO J*, 2004). In aggiunta, evidenze sperimentali dimostrano che PI3K γ controlla la funzione dei linfociti non solo in modo indiretto attraverso la regolazione delle cellule dendritiche, ma anche modulando direttamente la migrazione delle cellule T. Infatti, la migrazione verso CCL19, CCL12 e CCL21 di cellule CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ ottenute da topi PI3K γ *knock-out* è significativamente ridotta rispetto alla migrazione di cellule T *wild-type* (Reif et al., *J Immunol*, 2004).

L'espressione di PI3K γ anche nelle cellule strutturali dei vasi sanguigni suggerisce un ruolo di questa chinasi nel coordinare le interazioni tra leucociti ed elementi delle pareti dei vasi nei processi infiammatori. Infatti, è stato dimostrato che la presenza di PI3K γ nell'endotelio contribuisce in parte alla risposta immunitaria innata, regolando la capacità delle molecole di selectina-E espresse sull'endotelio stimolato con $\text{TNF}\alpha$ di interagire efficientemente con i neutrofili circolanti (Puri et al., *Blood*, 2005).

La funzione *scaffold* di PI3K γ nella regolazione della contrattilità

Nonostante PI3K γ sia espressa ad alti livelli soprattutto in cellule immunocompetenti, essa è presente in piccole quantità anche in cellule strutturali dell'organismo, come cellule endoteliali, neuroni e cardiomiociti. Proprio in quest'ultimo tipo cellulare è dimostrato per la prima volta che accanto all'attività di chinasi lipidica e proteica, PI3K γ può agire anche come una proteina *scaffold* nella regolazione dell'omeostasi dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) a valle dei recettori β -adrenergici (β -ARs) e regolare la contrattilità.

Il signaling dei β_2 -ARs nella contrazione della muscolatura liscia

I recettori adrenergici sono una classe di recettori accoppiati a proteine G (GPCR) che mediano la risposta alle catecolamine, in particolare noradrenalina ed adrenalina. Essi vengono divisi in due gruppi principali, α e β , che a loro volta comprendono diversi sottotipi. I recettori β -adrenergici (β -ARs) sono recettori a sette eliche transmembrana accoppiati a proteine G stimolatorie (G_s) e generalmente sono responsabili del rilassamento della muscolatura liscia e della contrazione del miocardio. Essi sono suddivisi in tre sottotipi (β_1 , β_2 e β_3) e hanno un'espressione tessuto-specifica. In particolare, i recettori β_2 -ARs hanno un'espressione piuttosto ampia, in quanto sono presenti ad esempio nel cuore, nel polmone e nel fegato (Sylvén et al., *Cardiovasc Res*, 1991; Mak et al., *Eur J Pharmacol*, 1996; Arner et al., *J Clin Endocrinol Metab*, 1990).

I recettori β_2 -ARs non hanno una struttura rigida, al contrario si pensa che possano oscillare tra una conformazione attiva ed una inattiva. Essi vengono attivati in seguito al legame di agonisti endogeni come catecolamine, o esogeni come Isoproterenolo. Il legame dell'agonista determina un cambiamento conformazionale nel recettore, che attiva la proteina G_s associata, causando la

dissociazione della subunità $G_{\alpha s}$ -GTP dal dimero $G_{\beta\gamma}$. La subunità $G_{\alpha s}$ lega ed attiva a sua volta l'enzima adenilato ciclasi (AC), localizzato a livello della membrana plasmatica e responsabile della sintesi di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) a partire da ATP. Il cAMP è un messaggero secondario ubiquitario, la cui principale funzione è quella di attivare la proteina chinasi A (PKA). La PKA inattiva è un eterotetramero costituito da due subunità regolatorie e due subunità catalitiche. Il legame di due molecole di cAMP a domini localizzati nelle subunità regolatorie di PKA induce un cambiamento conformazionale che determina il rilascio delle subunità catalitiche nella loro forma attiva. Le subunità catalitiche attivate sono in grado di fosforilare residui di serina e treonina localizzati su proteine intracellulari coinvolte nella regolazione del tono muscolare. Attraverso la fosforilazione di fosfolipasi C (PLC) e fosfolambano (PLB), PKA inibisce il rilascio nel citosol degli ioni calcio (Ca^{2+}) contenuti nel reticolo sarcoplasmatico, favorendo in ultima analisi il rilassamento muscolare. Inoltre mediante la fosforilazione della chinasi della miosina a catena leggera (MLCK), PKA riduce l'affinità di questa proteina per la Ca^{2+} -calmodulina, riducendo la fosforilazione della miosina a catena leggera e quindi la contrazione del muscolo liscio (Conti and Adelstein, *J Biol Chem*, 1981; Gao et al., *IUBMB Life*, 2001) (Fig. 2).

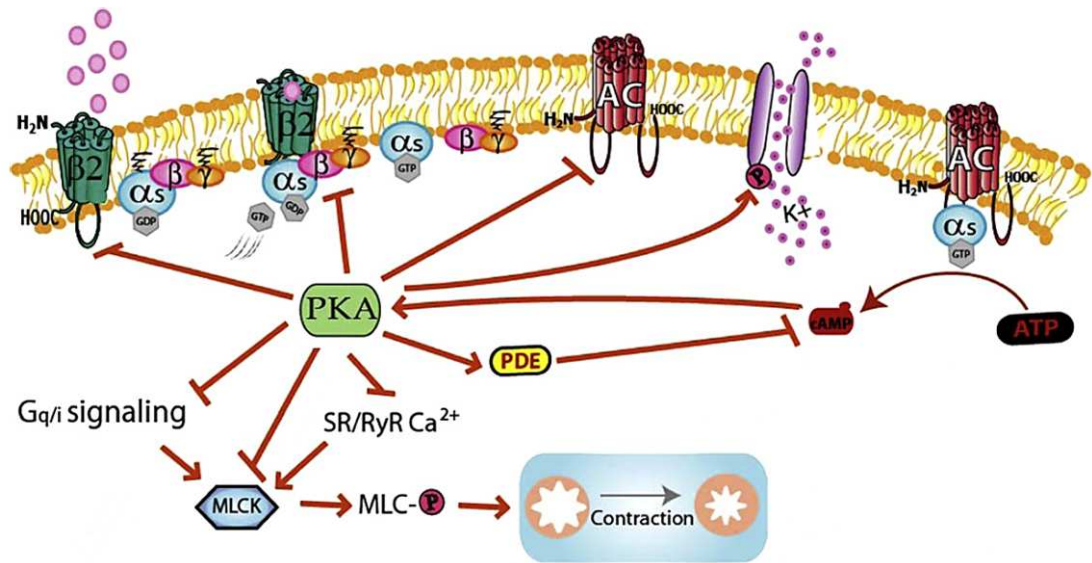


Figura 2: La via di segnalazione β_2 -ARs/cAMP/PKA nel muscolo liscio. Il legame di agonisti ai β_2 -ARs determina un cambiamento conformazionale nel recettore, che attiva la proteina G associata. La subunità $G_{\alpha s}$ lega ed attiva l'adenilato ciclasi (AC), che catalizza la conversione dell'ATP presente nel citoplasma in cAMP. Il cAMP è un messaggero secondario ubiquitario, la cui principale funzione è quella di attivare la proteina chinasi A (PKA). Essa è responsabile della fosforilazione di molte proteine che regolano la contrazione del muscolo liscio. Ad esempio attraverso la fosforilazione di recettori accoppiati a proteine G_q/G_i e della fosfolipasi C (PLC), PKA inibisce la sintesi di inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3), e di conseguenza il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico (SR). PKA fosforila il recettore dell' IP_3 e i recettori della rianodina (RyR), riducendo ulteriormente la mobilitazione di calcio dal reticolo sarcoplasmatico. Attraverso la fosforilazione della chinasi della miosina a catena leggera (MLCK), PKA ne riduce l'affinità per la Ca^{2+} -calmodulina, diminuendo il livello di fosforilazione della miosina a catena leggera (MLC), da cui dipende la contrazione del muscolo liscio. PKA fosforila i canali del potassio presenti sulla membrana plasmatica, favorendo la loro conformazione "aperta", cioè il rilascio di potassio (K^+) dal citoplasma, e promuovendo l'iperpolarizzazione cellulare. Infine PKA regola negativamente questa via di segnalazione, aumentando l'attività delle fosfodiesterasi (PDE) che degradano il cAMP. (Billington et al., *Pulm Pharmacol Ther*, 2012).

La via di segnalazione a valle dei recettori β_2 -ARs viene regolata negativamente dall'attività delle fosfodiesterasi (PDE), che convertono il cAMP in 5'-AMP. Ad oggi sono state identificate undici famiglie di fosfodiesterasi, ciascuna delle quali comprende diverse isoforme, ma le fosfodiesterasi-4 sono le uniche ad avere un'espressione ubiquitaria (Omori and Kotera, *Circ Res*, 2007). Diversi studi hanno dimostrato l'importanza delle PDE nella formazione di *pool* localizzati di cAMP a valle della stimolazione β -adrenergica (Jurevicius et al, *J Physiol*, 2003). In seguito a stimolazione dei recettori β_2 -ARs il cAMP non aumenta in modo uniforme nella cellula (Zaccolo and Pozzan, *Science*, 2002), ma piuttosto vengono generati per azione delle PDE dei microdomini a valle del recettore in cui il cAMP è elevato. In queste regioni subcellulari vengono quindi reclutate numerose proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, consentendo di regolare finemente la risposta cellulare ad un determinato stimolo (Scott and Pawson, *Science*, 2009).

Il reclutamento di substrati ed effettori a livello dei *pool* di cAMP è possibile grazie all'azione delle proteine di ancoraggio di PKA (AKAP) (Carr et al., *J Biol Chem*, 1991; Jarnaess and Tasken, *Biochem Soc Trans*, 2007). Le AKAP comprendono diverse famiglie di proteine strutturalmente differenti, ma accomunate dalla capacità di legare PKA. Tutte le AKAP contengono un dominio di legame a PKA e un dominio di *targeting* che permette la localizzazione subcellulare del complesso AKAP-PKA. In aggiunta a questi due domini, molte AKAP sono in grado anche di formare complessi multivalenti per la trasduzione del segnale attraverso il legame a fosfoproteine, fosfatasi ed altre chinasi. Mediante questo ruolo essenziale di coordinamento spaziale e temporale di effettori e substrati, le AKAP garantiscono un elevato livello di specificità nella regolazione del *pathway* cAMP/PKA (Diviani et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011).

Il ruolo di PI3K γ nel signaling del cAMP

La prima indicazione del coinvolgimento di PI3K γ nell'omeostasi del cAMP deriva dallo studio della funzionalità cardiaca di topi PI3K γ *knock-out*. Il cuore di questi topi non mostra evidenti alterazioni strutturali, ma presenta un marcato aumento della contrattilità basale dovuto ad un significativo innalzamento dei livelli di cAMP nel miocardio (Crackower et al., *Cell*, 2002). Al contrario, topi PI3K γ *kinase-dead* mostrano livelli normali di cAMP e un'inalterata capacità contrattile (Patrucco et al., *Cell*, 2004). Ciò ha suggerito l'ipotesi che la modulazione della contrattilità cardiaca fosse scorrelata dall'attività enzimatica di PI3K γ e che dipendesse piuttosto da interazioni proteina-proteina. In accordo con questa ipotesi, è stato dimostrato che nei cardiomiociti p110 γ è responsabile dell'assemblaggio di un complesso proteico comprendente la subunità regolatoria p84/87, la fosfodiesterasi 3B (PDE3B) e PKA (Patrucco et al., *Cell*, 2004; Perino et al., *Mol Cell*, 2011). In questo complesso, p110 γ agisce come una AKAP, in quanto lega in modo diretto le subunità RII α di PKA, promuovendo l'attivazione di PDE3B e determinando una conseguente riduzione dei livelli di cAMP (Fig. 3). Il disassemblaggio di questo complesso nei topi PI3K γ *knock-out*, ma non in quelli PI3K γ *kinase-dead*, determina una globale riduzione dell'attività fosfodiesterasica e causa un'anomalia nei livelli cardiaci di cAMP, responsabile dell'aumento della contrattilità.

A livello cardiaco anche l'attività delle PDE4 viene regolata da PI3K γ e tale regolazione previene lo sviluppo di aritmie ventricolari calcio-dipendenti (Ghigo et al., *Circulation*, 2012). Nei cardiomiociti infatti PI3K γ partecipa alla formazione di un complesso proteico che permette a PKA di regolare l'attività di PDE3A, PDE4A e PDE4B. Tale interazione presente nei topi PI3K γ *wild-type* e *kinase-dead* permette di regolare negativamente i livelli di cAMP durante la stimolazione β -adrenergica e di contenere la fosforilazione da parte di PKA dei canali del calcio di tipo L (LTCC) e del fosfolambano (PLB). Nei cardiomiociti PI3K γ *knock-out*, LTCC e PLB risultano iper-fosforilati. Ciò causa un aumento

significativo del rilascio di ioni calcio dal reticolo sarcoplasmatico sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione β -adrenergica.

Questi studi condotti sui cardiomiociti identificano quindi PI3K γ come un regolatore negativo del *signaling* a valle dei recettori β -adrenergici, che è in grado di modulare l'attività di diverse PDE attraverso l'interazione con PKA.

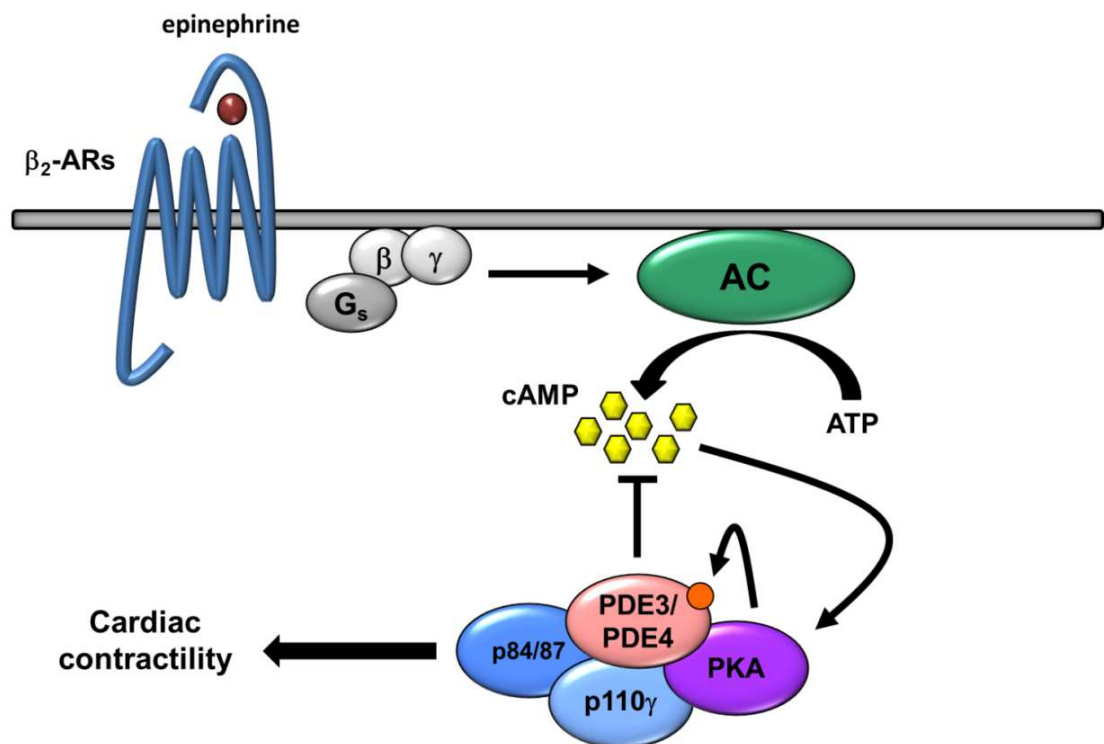


Figura 3: La funzione *scaffold* di PI3K γ nel miocardio. Nei cardiomiociti, la contrazione è modulata dalla via di segnalazione β_2 -ARs / cAMP / PKA. Il legame di catecolamine al recettore β -adrenergico promuove l'attività dell'adenilato ciclasi (AC), che aumenta i livelli di cAMP in domini intracellulari definiti, permettendo a PKA di contattare i suoi substrati in modo altamente regolato. Nei cardiomiociti, p110 γ è responsabile dell'assemblaggio di un complesso di segnalazione, che comprende la subunità regolatoria p84/87, le fosfodiesterasi 3 e 4 (in particolare, PDE3A, PDE3B, PDE4A e PDE4B) e PKA. In questo complesso, PI3K γ agisce come una AKAP e promuove l'attivazione delle fosfodiesterasi mediata da PKA e la conseguente riduzione dei livelli di cAMP a valle della stimolazione β -adrenergica.

Scopo della tesi

Il tono della muscolatura liscia delle vie aeree viene regolato dall'interazione tra diversi agonisti e recettori accoppiati a proteine G, che attivano la sintesi di messaggeri secondari in grado di modulare la risposta contrattile del tessuto. Il legame di neurotrasmettitori come acetilcolina, serotonina ed istamina ai loro specifici recettori determina la formazione di due messaggeri secondari: il 1,2-diacilglicerolo (DAG), che attiva la proteina chinasi C (PKC), e l'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃), che si lega ad un recettore intracellulare, determinando il rilascio di Ca²⁺ dal reticolo sarcoplasmatico. Sia l'attivazione di PKC che il flusso di calcio sono eventi necessari per determinare l'inizio della risposta contrattile nel muscolo liscio respiratorio e ne regolano durata e intensità. Al contrario, il legame di neurotrasmettitori come adrenalina e noradrenalina a recettori β -adrenergici determina la sintesi di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) che, attraverso l'attivazione della proteina chinasi A (PKA), induce la fosforilazione di specifiche proteine mediando il rilassamento del muscolo.

Poiché la costrizione delle vie aeree rappresenta una delle caratteristiche principali dell'asma bronchiale, una malattia respiratoria cronica largamente diffusa, la via di segnalazione β_2 -ARs/cAMP/PKA viene bersagliata a più livelli dalle terapie farmacologiche in uso. Ad esempio, gli agonisti dei recettori β_2 -ARs a lunga durata d'azione (*long acting β_2 -agonists*, LABA) sono i farmaci più utilizzati (in combinazione con farmaci anti-infiammatori) per il trattamento dei pazienti asmatici, sia durante le esacerbazioni che nella terapia di mantenimento. Un altro esempio di farmaci che colpiscono la via di segnalazione β_2 -ARs/cAMP/PKA sono gli inibitori delle fosfodiesterasi 4 (PDE4). Essi vengono utilizzati soprattutto per le loro proprietà anti-infiammatorie, ma è stato dimostrato che possono agire anche come broncodilatatori, aumentando il cAMP nel muscolo liscio delle vie aeree. Dal momento che molte terapie farmacologiche agiscono sulla via di segnalazione β_2 -ARs/cAMP/PKA risulta importante comprendere i meccanismi molecolari che regolano l'attività di queste proteine.

La recente scoperta della funzione *scaffold* di PI3K γ nei cardiomiociti ha aggiunto nuovi elementi utili alla comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la contrattilità cardiaca. E' stato infatti dimostrato che nel cuore PI3K γ

agisce come un modulatore negativo della segnalazione mediata dai recettori β_2 -ARs e che la sua attività *scaffold* è indispensabile per regolare correttamente l'omeostasi del cAMP e ridurre il rischio di insorgenza di patologie cardiache, come lo scompenso o le aritmie ventricolari.

Alla luce delle nuove conoscenze ottenute sulla contrazione cardiaca, in questo lavoro di tesi è stato studiato il ruolo di PI3K γ nella regolazione della contrazione della muscolatura liscia delle vie aeree. In particolare, è stata analizzata la capacità di PI3K γ di interagire con proteine importanti nella regolazione dell'omeostasi del cAMP a valle dei recettori β_2 -ARs, come fosfodiesterasi e PKA, in cellule muscolari lisce delle vie aeree. Utilizzando cellule muscolari lisce ottenute da topi *wild-type*, *kinase-dead* e *knock-out* per PI3K γ è stata valutata la capacità di questa proteina di interagire con la fosfodiesterasi 4B e di regolarne l'attività enzimatica, modulando i livelli intracellulari di cAMP.

Materiali e metodi

Anticorpi e reagenti

Anticorpi monoclonali contro p110 γ sono stati utilizzati secondo quanto già pubblicato (Hirsch et al., *Science*, 2000; Perino et al., *Mol Cell*, 2011). PDE4B è stata immunoprecipitata e analizzata in Western blot utilizzando un anticorpo policlonale prodotto in coniglio gentilmente fornito dal prof. Marco Conti (University of California San Francisco, San Francisco, CA). L'anticorpo monoclonale prodotto in topo diretto contro PDE3A è stato donato dalla prof.ssa Chen Yan (University of Rochester Medical Center, Rochester, NY). Il siero assorbito ottenuto in coniglio diretto contro p84/87, l'antisiero prodotto in capra e diretto contro p84/87 e il siero prodotto in coniglio contro p101 sono stati forniti dal prof. Matthias P. Wymann (Università di Basilea, Basilea, Svizzera). Sono inoltre stati utilizzati i seguenti anticorpi commerciali: anticorpi secondari coniugati con HRP, mouse anti- α -smooth muscle actin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO); rabbit anti-PKA subunità catalitica α , mouse anti-PKA subunità regolatoria RII α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); mouse anti-PKA subunità regolatoria RII α (BD Bioscience, San Jose, CA); anticorpo secondario Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA).

Carbaco, Isoproterenolo, CPG-20712A, Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate, gelatina e fibronectina sono stati acquistati da Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), siero fetale bovino (FBS), tripsina-EDTA 0.5% (10x), penicillina-streptomicina-glutammina (100x), Hanks balanced salt solution (HBSS), antibiotico-antimicotico (100x) sono stati acquistati da Life Technologies (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA).

Costrutti

Il plasmide PI3K γ -pcDNA3 è stato gentilmente fornito da Reinhard Wetzker (Friedrich Schiller University, Jena, Germany). Il costrutto per

l'espressione di PDE4B è stato fornito da Marco Conti (University of California San Francisco, San Francisco, CA). La sonda FRET ICUE3-pcDNA3 è stata ottenuta seguendo quanto già riportato in letteratura (DiPilato and Zhang, *Mol Biosyst*, 2009).

I costrutti shRNA human PIK3CG pGFP-V-RS e *scrambled* pGFP-V-RS sono stati acquistati da OriGene (OriGene Technologies, Rockville, MD).

Risposta contrattile in trachee murine isolate

La tensione isometrica esercitata dalle trachee è stata misurata utilizzando la tecnica del miografo a filo (Danish Myo Technologies), secondo il protocollo di Mulvany e Halpern (*Circ. Res*, 1977).

In breve, i topi PI3K γ *wild-type*, PI3K γ *knock-out* e PI3K γ *kinase-dead* sono stati anestetizzati e sacrificati mediante recisione dell'aorta addominale. La gabbia toracica è stata aperta e l'intero albero respiratorio è stato immerso in soluzione Krebs-Ringer (118 mM NaCl; 4.6 mM KCl; 23 mM NaHCO₃; 1.2 mM MgSO₄; 1.2 mM KH₂PO₄; 1.2 mM CaCl₂; 10 mM glucose; 0.025 mM EDTA, pH 7.4). L'esofago e i polmoni sono stati rimossi e, utilizzando un microscopio per dissezione, dalla trachea sono stati ottenuti dei segmenti di 2-3 mm di lunghezza. I segmenti sono stati montati su un miografo a filo, facendo passare al loro interno due fili in acciaio del diametro di 100 μ m, fissati a due supporti. Un supporto è collegato ad un micrometro e permette il controllo della circonferenza dell'anello, mentre l'altro supporto è collegato ad un trasduttore di forza per la misurazione della tensione isometrica. Per ciascun preparato è stata costruita la curva lunghezza-pressione e da questa sono stati ricavati la tensione a riposo e il diametro del preparato. Tale curva si ottiene tendendo gradualmente i segmenti di trachea sul miografo fino al raggiungimento di una tensione standard di 5mN. Una volta raggiunta la tensione di riposo di 5mN, i supporti del miografo sono stati mantenuti in questa posizione per l'intera durata dell'esperimento e i preparati sono stati equilibrati per 30minuti in 5 ml di soluzione di Krebs-Ringer, gorgogliata con una miscela di O₂ 95%/CO₂ 5% a 37°C. Dopo la normalizzazione, la responsività dei preparati è stata saggiata aggiungendo

KPSS 10 mM e carbacolo 1 μ M direttamente nella camera del miografo. In seguito, i segmenti di trachea sono stati incubati per 10 minuti con veicolo e sono state ottenute curve concentrazione-risposta al carbacolo aggiungendo concentrazioni crescenti del contratturante (10^{-9} M – 10^{-4} M) nella camera del miografo. La risposta contrattile è stata espressa come tensione isometrica media, calcolata dividendo la tensione isometrica registrata per la lunghezza del segmento di trachea.

Cellule muscolari lisce delle vie aeree umane

Cellule muscolari lisce delle vie aeree umane (ASMC) sono state acquistate da Lonza (Basel, CH).

Le cellule ASMC sono state mantenute in DMEM addizionato con FBS 10%, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina, 100 U/ml streptomicina in un'atmosfera composta da 95% aria e 5% CO₂ a 37°C. Le cellule ASMC sono state utilizzate per gli esperimenti nei passaggi compresi tra 1 e 8.

Cellule HEK293

La linea cellulare HEK293 è costituita da cellule epiteliali del rene umano trasformate stabilmente con la regione E1A del genoma adenovirale. La loro caratteristica principale è l'elevata efficienza di trasfezione e per questo vengono ampiamente utilizzate per l'espressione di cDNA esogeno.

Le cellule HEK293 utilizzate in questo lavoro di tesi sono state acquistate da Interlab Cell Line Collection (ICLC, Genova).

Le cellule HEK293 sono state mantenute in DMEM addizionato con FBS 10%, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina, 100 U/ml streptomicina in un'atmosfera composta da 95% aria e 5% CO₂ a 37°C. Le cellule HEK293 sono state utilizzate per gli esperimenti nei passaggi compresi tra 1 e 15.

Cellule muscolari lisce della trachea murina

I topi PI3K γ *wild-type*, PI3K γ *knock-out* e PI3K γ *kinase-dead* sono stati anestetizzati e sacrificati mediante recisione dell'aorta addominale. La gabbia toracica è stata aperta e l'intero albero respiratorio è stato prelevato. In seguito alla rimozione dell'esofago e dei polmoni, la trachea è stata posta in una piastra Petri contenente HBSS addizionato con antibiotico-antimicotico 2X. I tessuti di rivestimento sono stati rimossi con l'ausilio di un microscopio per dissezione e la trachea è stata tagliata longitudinalmente e dissezionata in segmenti di 2-3 mm. Tutti i segmenti ottenuti dalla stessa trachea sono stati posizionati in una piastra Petri da 60 mm in modo che l'intima tracheale fosse a contatto con la superficie della piastra. Dopo aver lasciato aderire i segmenti sono stati aggiunti 2.5 ml di DMEM addizionato con FBS 20% e antibiotico-antimicotico 2X per ricoprire gli espianti. Le piastre così ottenute sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata composta da 95% aria e 5% CO₂. Dopo i primi tre giorni, la concentrazione di FBS nel terreno di coltura è stata ridotta al 10% e l'antibiotico-antimicotico è stato ridotto alla concentrazione 1X. I segmenti di trachea vengono rimossi quando le cellule hanno raggiunto una locale confluenza. Il giorno dopo la rimozione degli espianti, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA e seminate in piastre Petri da 60 mm con un rapporto 1:1, mentre per i passaggi successivi è stato utilizzato un rapporto 1:2. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando cellule confluenti al passaggio 3.

Trasfezione cellulare

Trasfezione di cellule HEK293 con il metodo del fosfato di calcio

Le cellule HEK293 sono state seminate in piastre Petri da 90 mm ad una densità tale da raggiungere il 50%-60% di confluenza il giorno successivo. La soluzione di trasfezione è stata preparata diluendo un totale di 10 μ g di cDNA in

acqua sterile e aggiungendo a questa soluzione cloruro di calcio 250mM. La soluzione contenente il DNA è stata quindi aggiunta lentamente ad una soluzione di HBS 2X (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.12) mescolando continuamente per favorire la formazione dei cristalli di fosfato di calcio e DNA. La mix di trasfezione così preparata è stata incubata a temperatura ambiente per 20 minuti e quindi aggiunta alle cellule direttamente nel terreno di coltura. Dopo 8 ore il terreno di coltura è stato rinfrescato per limitare l'effetto tossico dei cristalli di fosfato di calcio e DNA. Le cellule HEK293 sono state incubate overnight a 37°C in atmosfera umidificata composta da 95% aria e 5% CO₂ ed utilizzate il giorno seguente per gli esperimenti.

Elettroporazione di cellule ASMC

Le cellule ASMC sono state co-trasfettate utilizzando l'elettroporatore Amaxa™ Nucleofector™ e il kit Basic Smooth Muscle Cells (SMC) Nucleofector® (Lonza, Basel, CH) con la sonda FRET ICUE3 (*Indicator of cAMP Using EPAC 3*; DiPilato and Zhang, *Mol Biosyst*, 2009) e con un plasmide per il silenziamento di PI3Ky umana (PIK3CG pGFP-V-RS, OriGene, Rockville, MD). ICUE3 è un biosensore per lo studio della modulazione spaziale e temporale del cAMP in cellule vive utilizzando la microscopia a fluorescenza. La sonda ICUE3 è stata ottenuta affiancando alla proteina Epac1 due varianti della *green fluorescent protein* (GFP). Epac1 (*exchange protein directly activated by cAMP*) è una GEF (*guanine exchange factor*), che promuove l'attivazione della piccola GTPasi Rap1 in modo dipendente dal cAMP. In seguito all'interazione con cAMP, la sonda ICUE subisce un cambiamento conformazionale che allontana le due GFP e determina una riduzione nella fluorescenza dovuta al trasferimento di energia per risonanza (FRET). I biosensori ICUE basati su Epac sono in grado di misurare in modo sensibile e in tempo reale la produzione e la degradazione di cAMP. Per ottenere un buon rapporto segnale/background è molto importante disporre di sensori con un vasto *range* dinamico ed elevata sensibilità. Per questo motivo la sonda ICUE3 contiene *cyan fluorescent protein* (CFP) come donatore di fluorescenza e cpVenus, una variante di *yellow fluorescent protein* (YFP) come accettore (DiPilato and Zhang, *Mol Biosyst*, 2009).

Il plasmide pGFP-V-RS (*retroviral silencing plasmid*) utilizzato per il silenziamento contiene sequenze LTR (*long terminal repeats*) di retrovirus murini, geni per la resistenza a puomicina e kanamicina, il gene codificante per la turbo GFP e un promotore U6. La cassetta di espressione del shRNA è costituita da due sequenze di 29 nucleotidi complementari tra loro, separate da un *loop* di 7 nucleotidi. Da questa struttura a forcina vengono prodotti i siRNA (*small interfering RNA*), le cui sequenze inducono il silenziamento del gene bersaglio attraverso la degradazione del corrispondente RNA messaggero. Come controllo negativo è stato utilizzato un plasmide *scrambled* incapace di appaiarsi correttamente con la sequenza mRNA di PI3K γ .

Le cellule ASMC sono state coltivate in fiasche da 75 cm² e, al raggiungimento dell'80% di confluenza, sono state staccate con tripsina-EDTA e contate nella camera di Burker per determinare la densità cellulare. In seguito, le cellule sono state centrifugate (1×10^6 per campione) a 100g per 10 minuti e risospese in 100 μ l di Nucleofector™ Solution per ciascun campione. A questa sospensione cellulare è stato aggiunto 1 μ g di ICUE3 e 1 μ g di PIK3CG pGFP-V-RS, i campioni sono stati trasferiti nelle cuvette per l'elettroporazione ed è stato selezionato il programma G-009 sullo strumento. Al termine del programma, sono stati aggiunti 500 μ l di terreno di coltura nella cuvetta e le cellule sono state seminate su piastre Petri di vetro pre-trattate con una soluzione di gelatina 0.2% e fibronectina 15mg/ml per 30 minuti. Gli esperimenti di FRET sono stati effettuati su cellule vive 72 ore dopo la trasfezione.

FRET imaging e analisi

Le cellule ASMC sono state mantenute in soluzione di Ringer a pH 7.4, contenente 121.6 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 4 mM NaHCO₃, 0.8 mM NaH₂PO₄, 5 mM D-glucosio, 5 mM piruvato di sodio, 10 mM HEPES. La quantificazione del cAMP in cellule ASMC esprimenti il shRNA per il silenziamento di PI3K γ è stata effettuata grazie alla co-espressione di ICUE3. L'*imaging* delle cellule trasfettate è stato effettuato utilizzando un sistema Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc, Buffalo Grove, IL, USA) con un laser ad argon e

lenti 63x ad immersione. Le lunghezze d'onda di eccitazione utilizzate sono 458 nm per CFP e 514 nm per YFP. Le immagini sono state acquisite ad intervalli di 4 secondi, ad una velocità di scansione di 400 MHz e ad una risoluzione di 512x512 pixel. L'efficienza di FRET è stata calcolata con l'applicazione *wizard* Leica per l'*imaging* dell'emissione FRET, secondo la formula: $E_A(i) = B/A$, dove $E_A(i)$ è l'efficienza apparente di FRET; A è l'intensità del canale CFP e B è l'intensità del canale FRET.

Estrazione di proteine da trachea

Le trachee sono state rimosse, pulite dai tessuti esterni, congelate in azoto liquido e omogeneizzate in una soluzione di lisi contenente NaCl 120mM, Tris-HCl (pH 8.0) 50mM, Triton X-100 1%, inibitori delle proteasi (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), PMSF 1mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) e inibitori delle fosfatasi (NaF 50mM, ortovanadato di sodio 1mM e pirofosfato di sodio 10mM). I campioni sono stati incubati in agitazione a 4°C per 30 minuti e in seguito centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. La concentrazione delle proteine è stata determinata con il metodo di Bradford. Gli estratti sono stati sottoposti a pre-clearing mediante l'incubazione per 30 minuti con 30µl di Sefarosio-A (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Successivamente gli estratti sono stati incubati per 2h a 4°C in agitazione con 20µl di Sefarosio-A o -G e con 1µg di anticorpo per mg di proteina immunoprecipitata. Gli immunocomplessi legati alle biglie di Sefarosio-A o -G sono stati lavati per minimizzare le interazioni aspecifiche ed utilizzati per l'analisi Western blot o per il saggio di attività fosfodiesterasica.

Estrazione di proteine da colture cellulari

Cellule ASMC, TMSC e HEK293 sono state lisate utilizzando un *cell scraper* in una soluzione di lisi contenente NaCl 120mM, Tris-HCl (pH 8.0) 50mM, Triton

X-100 1%, addizionata con inibitori di proteasi e fosfatasi come descritto in precedenza. Gli estratti sono stati incubati per 10 minuti in ghiaccio e quindi centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. La concentrazione delle proteine è stata determinata con il metodo di Bradford. I surnatanti sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione ed utilizzati per il saggio di attività fosfodiesterasica o per l'analisi Western blot.

Saggio di attività fosfodiesterasica

L'attività fosfodiesterasica negli immunoprecipitati è stata misurata seguendo il metodo descritto da Thomson e Appleman (J Biol Chem, 1971; Patrucco et al., 2004). In breve, gli immunoprecipitati sono stati incubati in 200µl di soluzione di reazione contenente Tris-HCl (pH 8.0) 40mM, MgCl₂ 5mM, 2-mercapto-etanolo 10mM e 0.1µCi [³H]cAMP (circa 1x10⁵ cpm per campione, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), con o senza cAMP 1µM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). I campioni sono stati incubati in agitazione a 33°C per 5-40 minuti e scaldati per 3 minuti a 95°C per terminare la reazione. Il 5'-AMP prodotto dalla reazione è stato idrolizzato incubando i campioni con 50µg di veleno del serpente *Crotalus Atrox* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) per 15 minuti a 37°C. L'adenosina idrolizzata è stata purificata mediante cromatografia a scambio anionico, utilizzando 400µl di una sospensione al 30% (w/v) di resina Dowex AG1-X8 (Bio-Rad, Segrate, Milano, Italy) e centrifugando i campioni a 13000 rpm per 3 minuti a 4°C. L'adenosina radiomarcata presente nel surnatante è stata quantificata mediante un contatore a scintillazione liquida (Ultima Gold scintillation liquid from Perkin Elmer, Waltham, MA).

Analisi Western blot

Per l'analisi Western blot gli estratti totali e gli immunoprecipitati ottenuti da colture cellulari o da trachea sono stati denaturati in Leammli buffer, scaldati

a 95°C per 5 minuti e sottoposti a SDS/PAGE, utilizzando gel di poliacrilammide 6% o 8%. In seguito, le proteine sono state trasferite su membrane di polivinilidenfluoruro (PVDF, Millipore, Billerica, MA). Il blocking delle membrane è stato effettuato in TBS-Tween 0.1% addizionato con BSA 5% per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state poi incubate overnight a 4°C con gli anticorpi primari indicati e sviluppate in chemiluminescenza (ECL, Millipore, Billerica, MA).

Immunofluorescenza

Cellule murine TSMC coltivate su vetrini copri-oggetto fino all'80% di confluenza sono state fissate per 10 minuti in PBS contenente paraformaldeide 4%. Dopo il fissaggio, i vetrini copri-oggetto sono stati lavati 3 volte in PBS per rimuovere l'eccesso di fissativo. Le cellule sono state permeabilizzate in PBS-T (Triton X-100 0.3%) per 5 minuti a temperatura ambiente e i siti aspecifici sono stati bloccati per 30 minuti in PBS-BSA 3%. I vetrini copri-oggetto sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario mouse anti- α -smooth muscle actin (1:500 in PBS-BSA 1%). I vetrini sono stati lavati 3 volte con PBS per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario ed incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse (1:1000 in PBS), in presenza di Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (1:500 in PBS) per la visualizzazione dell'actina filamentosa. Dopo 3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati montati con la soluzione ProLong® Gold Antifade (Life Technologies, Carlsbad, CA) e la fluorescenza è stata acquisita con il microscopio confocale a scansione laser Zeiss 510 Meta.

Topi

I topi *knock-out* (KO) e *kinase-dead* (KD) per PI3K γ utilizzati in questo studio sono stati descritti in precedenza (Hirsch et al., 2000; Patrucco et al.,

2004). I topi transgenici sono stati reincrociati con topi C57BL/6J per 15 generazioni per fissare il background genetico. Pertanto topi C57BL/6J sono stati utilizzati come controllo (*wild-type*, WT). Ciascun animale è stato utilizzato una sola volta per gli esperimenti e le condizioni sperimentali sono state ottimizzate per ridurre al minimo la sofferenza e il numero degli animali utilizzati. Tutte le procedure riguardanti gli animali da laboratorio sono state effettuate in accordo con la normativa europea ed italiana (Direttiva dell'Unione Europea 86/609/CEE, Decreto Legislativo 116/92).

Analisi statistica

Il software Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) è stato utilizzato per l'analisi statistica. Tutti i dati sono espressi come media $\pm$ errore standard della media (SEM). L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test ANOVA ad una via seguito dal test *post hoc* di Bonferroni per i confronti multipli oppure il test *t* di Student. Valori $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

Risultati

Il tessuto muscolare liscio della trachea esprime PI3K γ

Per verificare l'espressione di PI3K γ in cellule muscolari lisce della trachea murina (TSMC), in cellule muscolari lisce delle vie respiratorie umane (ASMC) e in trachee murine sono stati effettuati degli esperimenti di immunoprecipitazione a partire da lisati proteici totali. Gli immunoprecipitati sono stati sottoposti ad analisi Western blot, utilizzando estratti proteici totali di cellule mononucleate del sangue periferico umano (PBMC) come controllo positivo dell'espressione.

Come mostrato in Fig. 4 è stata confermata l'espressione di PI3K γ in TSMC, ASMC e nelle trachee murine. In particolare, cellule TSMC e ASMC esprimono solo l'isoforma corta di PI3K γ , che è priva di circa 20 aminoacidi al terminale amminico (Stephens, cell, 1997).

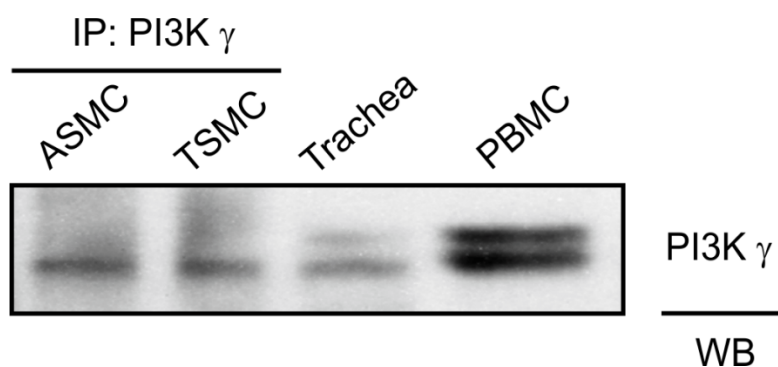


Figura 4: Analisi dell'espressione di PI3K γ in cellule muscolari lisce della trachea murina (TSMC), in cellule muscolari lisce delle vie respiratorie umane (ASMC) e in trachee murine complete. Analisi Western blot rappresentativa dell'espressione di PI3K γ negli immunoprecipitati di PI3K γ in TSMC, ASMC e negli estratti totali di trachea murina e cellule mononucleate del sangue periferico umano (PBMC).

PI3K γ regola la contrazione del muscolo liscio della trachea in modo indipendente dalla sua attività chinastica

Per esaminare il ruolo di PI3K γ nella broncocostrizione, è stata confrontata la contrattilità di trachee murine prelevate da animali PI3K γ *wild-type* (WT), PI3K γ *knock-out* (KO) o esprimenti una forma di PI3K γ priva dell'attività catalitica (*kinase-dead*, KD). A tale scopo, la risposta contrattile indotta da carbacolo (10^{-9}M – 10^{-4}M) nelle trachee di animali WT è stata confrontata con la contrazione ottenuta in trachee di topi KO e KD, utilizzando la metodica del miografo a filo. Come mostrato in Fig.5, la trachea degli animali KO ha una contrattilità ridotta rispetto alla trachea degli animali WT e KD. In particolare si osserva una significativa riduzione della tensione massima indotta dal carbacolo (E_{max} WT=3,42 $\pm$ 0,22; E_{max} KD=3,40 $\pm$ 0,16; E_{max} KO=2,47 $\pm$ 0,28), mentre non si osserva alcuna differenza nella sensibilità al contratturante (ED_{50} WT=0,33 μM $\pm$ 0,07; ED_{50} KD=0,29 μM $\pm$ 0,12; ED_{50} KO=0,31 μM $\pm$ 0,03).

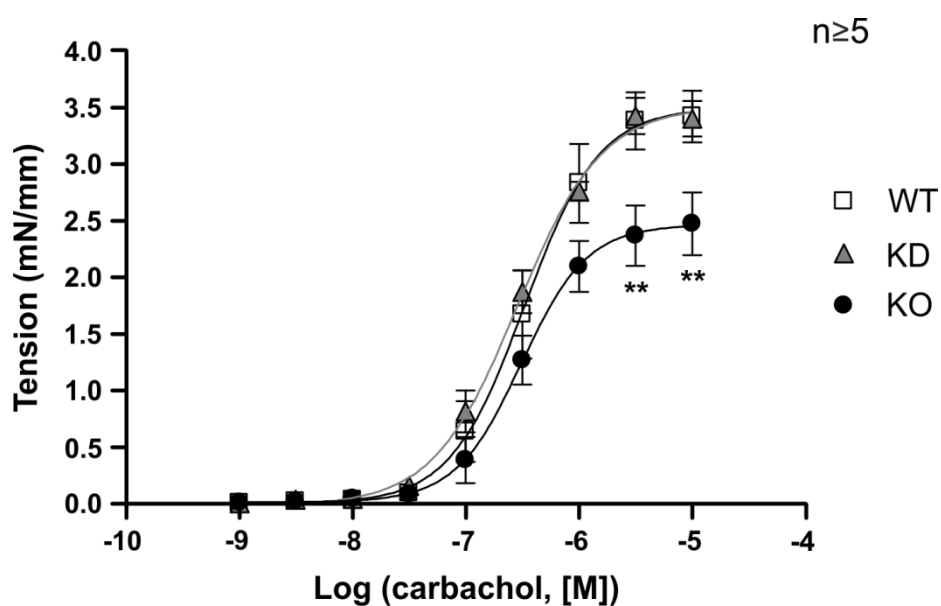


Figura 5: Effetto dell'inattivazione genetica di PI3K γ sulla risposta contrattile al carbacolo in trachee isolate di topo. Curve concentrazione-risposta al carbacolo costruite su segmenti di trachea isolati da topi C57BL/6J WT, KD e KO per PI3K γ . La contrazione è stata indotta incubando i preparati con concentrazioni crescenti di carbacolo (10^{-9} M – 10^{-4} M) ogni 2 minuti. La risposta contrattile è espressa come tensione isometrica media, calcolata dividendo la forza per la lunghezza del segmento di trachea. Ciascun punto rappresenta la media $\pm$ SEM di $n \geq 5$ animali. ** Statisticamente diverso da WT e KD: $P < 0.01$; ANOVA ad una via, test *post hoc* di Bonferroni.

PI3K γ si associa con PDE4B e ne regola l'attività enzimatica

Data la diminuita risposta al contratturante carbacholo osservata in trachee PI3K γ *knock-out*, si può ipotizzare che i livelli intracellulari di cAMP siano più elevati nelle cellule della muscolatura liscia mancanti di PI3K γ a causa di una ridotta attività delle fosfodiesterasi (PDE). Una delle fosfodiesterasi maggiormente espresse nella muscolatura liscia è PDE4B (Zhai et al, 2012). E' stata quindi valutata la capacità di questa proteina di interagire con PI3K γ e sono stati indagati gli effetti di tale interazione sull'attività enzimatica della fosfodiesterasi. A questo scopo sono stati effettuati degli esperimenti di co-immunoprecipitazione a partire da lisati proteici totali di trachee murine, prelevate da animali *wild-type* (WT) e *knock-out* (KO) per PI3K γ . Come mostrato in Fig. 6A, PI3K γ co-purifica con PDE4B in trachee PI3K γ WT mentre non è stata evidenziata alcuna interazione nei campioni ottenuti da animali PI3K γ KO. Successivamente è stata valutata l'attività catalitica di PDE4B negli immunoprecipitati ottenuti da trachee di animali *wild-type* (WT), *kinase-dead* (KD) e *knock-out* (KO) per PI3K γ (Fig 6B). L'attività enzimatica di PDE4B è ridotta del 50% nei campioni ottenuti da trachee murine PI3K γ KO (WT=4615 $\pm$ 514 cpm/ip; KD=4754 $\pm$ 388 cpm/ip; KO=2287 $\pm$ 224 cpm/ip) e tale diminuzione non dipende da una ridotta espressione dell'enzima. Questi dati indicano quindi che PI3K γ interagisce con PDE4B e ne aumenta l'attività catalitica, probabilmente attraverso un meccanismo d'interazione proteina-proteina.

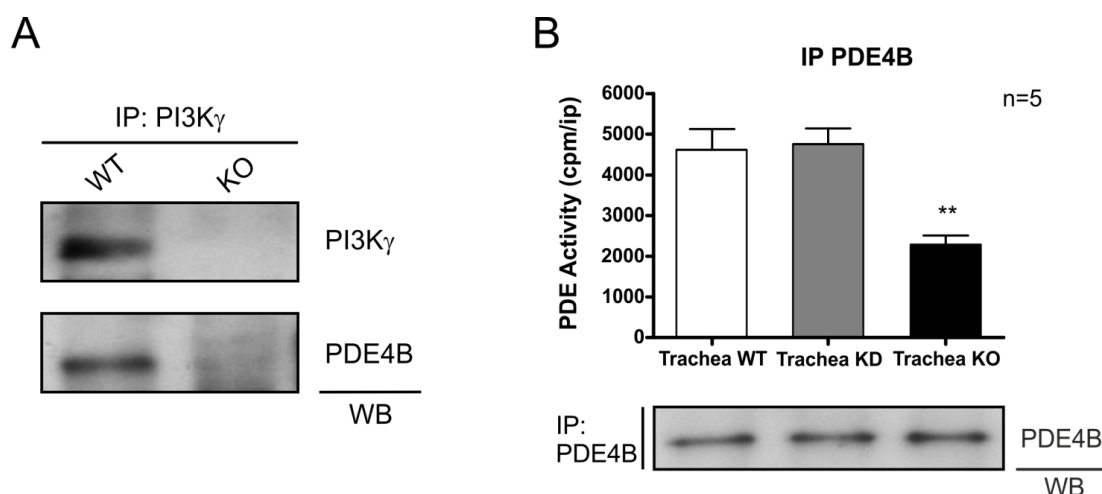


Figura 6: Effetto dell'interazione tra PI3K γ e PDE4B sull'attività catalitica della fosfodiesterasi in trachee murine.

(A) Analisi Western blot rappresentativa di PDE4B negli immunoprecipitati di PI3K γ ottenuti da trachee murine WT e KO per PI3K γ .

(B) Attività fosfodiesterasica immunoprecipitata con un anticorpo anti-PDE4B a partire da estratti totali di trachee WT, KD e KO per PI3K γ . L'attività enzimatica calcolata in cpm (conte per minuto) è stata rapportata alla quantità totale di proteina immunoprecipitata. Ciascun istogramma rappresenta la media $\pm$ SEM di n=5 esperimenti indipendenti. ** Statisticamente diverso da Trachea WT e Trachea KD: $P < 0.01$; ANOVA ad una via, test *post hoc* di Bonferroni. Viene riportata un'immunoprecipitazione rappresentativa dei livelli di espressione dell'enzima.

PI3K γ regola PDE4B ma non PDE3A in cellule muscolari lisce della trachea murina

Per valutare l'effetto dell'inattivazione genetica di PI3K γ sull'attività delle fosfodiesterasi nel muscolo liscio della trachea, sono state ottenute colture primarie di cellule muscolari lisce (TSMC) ottenute da espianti di trachee murine *wild-type* (WT), *kinase-dead* (KD) e *knock-out* (KO) per PI3K γ . Per ciascun espianto è stata verificata la presenza di cellule muscolari lisce valutando i livelli di espressione della proteina α -smooth muscle actin (α -SMA) mediante immunofluorescenza (Fig. 7A).

Analogamente a quanto riscontrato nelle trachee complete, l'attività catalitica di PDE4B risulta ridotta del 40% in TSMC KO rispetto a TSMC WT e KD (WT=28177 $\pm$ 2034 cpm/ip; KD=29039 $\pm$ 2851 cpm/ip; KO=17089 $\pm$ 2437 cpm/ip; P<0,01, Fig. 7B). Al contrario, l'attività catalitica di PDE3A, un'altra fosfodiesterasi presente nel muscolo liscio della trachea, risulta invariata in TSMC WT e KO per PI3K γ (Fig. 7C). Questi risultati supportano ulteriormente l'ipotesi che PI3K γ sia in grado di modulare l'attività catalitica di PDE4B in modo indipendente dalla sua attività chinasi. Inoltre tale meccanismo di regolazione non si è dimostrato comune a tutte le fosfodiesterasi.

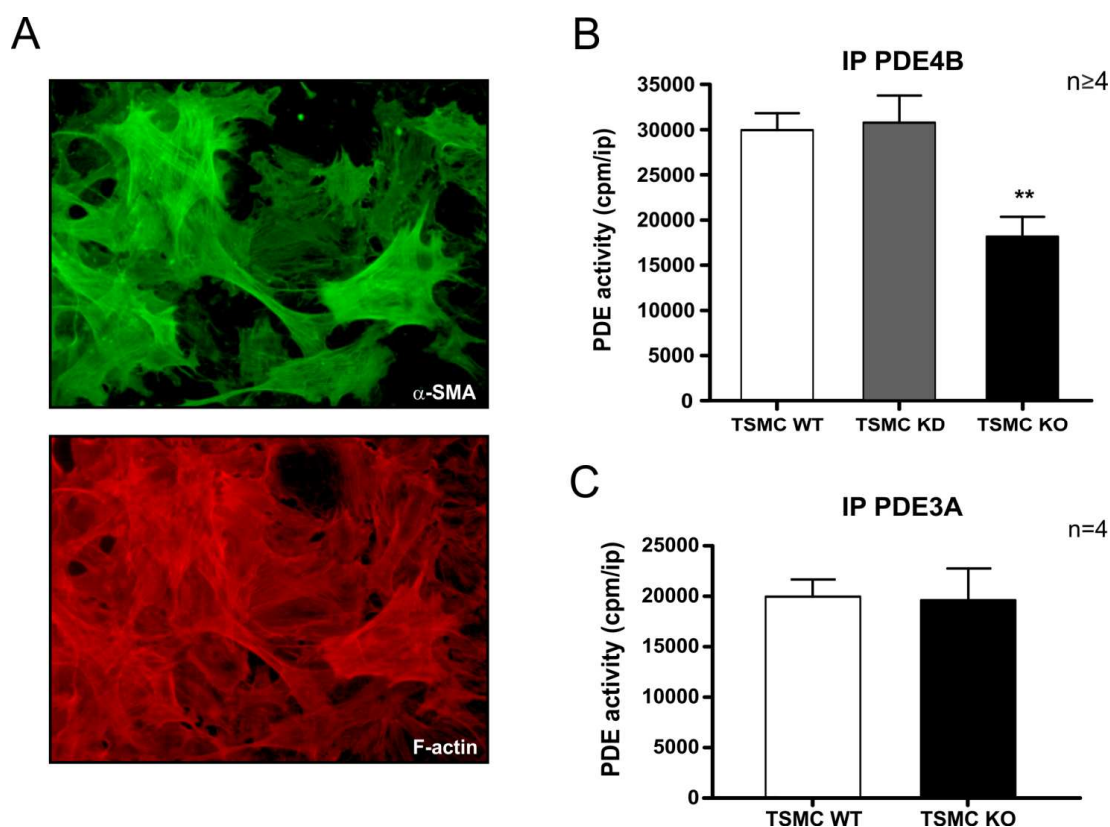


Figura 7: Attività enzimatica di PDE4B e PDE3A in cellule muscolari lisce della trachea murina ottenute da topi WT, KD e KO per PI3K γ .

(A) Immunofluorescenza rappresentativa dei livelli di espressione di α -smooth muscle actin (α -SMA) in cellule TSMC ottenute da espianti di trachea murina KO per PI3K γ . (B) Attività fosfodiesterasica immunoprecipitata con un anticorpo anti-PDE4B a partire da estratti proteici di colture cellulari TSMC ottenute da trachee murine WT, KD e KO per PI3K γ . (C) Attività fosfodiesterasica immunoprecipitata con un anticorpo anti-PDE3A a partire da estratti proteici di colture cellulari TSMC ottenute da trachee murine WT e KO per PI3K γ .

L'attività enzimatica calcolata in cpm (conte per minuto) è stata rapportata alla quantità totale di proteina immunoprecipitata. Ciascun istogramma rappresenta la media $\pm$ SEM di $n \geq 4$ esperimenti indipendenti. ** Statisticamente diverso da TSMC WT: $P < 0.01$, ANOVA ad una via, test *post hoc* di Bonferroni.

PI3K γ aumenta l'attività catalitica di PDE4B in cellule HEK293 trasfettate

Per supportare ulteriormente l'ipotesi che PI3K γ sia in grado di modulare l'attività catalitica di PDE4B, l'interazione tra le due proteine è stata studiata anche in cellule HEK293 trasfettate con cDNA plasmidici per l'espressione di PI3K γ e di PDE4B. A tale scopo, cellule HEK293 sono state seminate in piastre Petri e trasfettate con il protocollo del fosfato di calcio. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate e gli estratti proteici totali ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi Western blot e per il saggio di attività fosfodiesterasica.

Come mostrato in Fig. 8A, la co-trasfezione di PI3K γ e di PDE4B aumenta l'attività catalitica della fosfodiesterasi in cellule HEK293. Tale aumento è dovuto all'interazione tra le due proteine e non a differenze nei loro livelli di espressione, in quanto la trasfezione dei costrutti risulta bilanciata nelle diverse condizioni sperimentali (Fig. 8B).

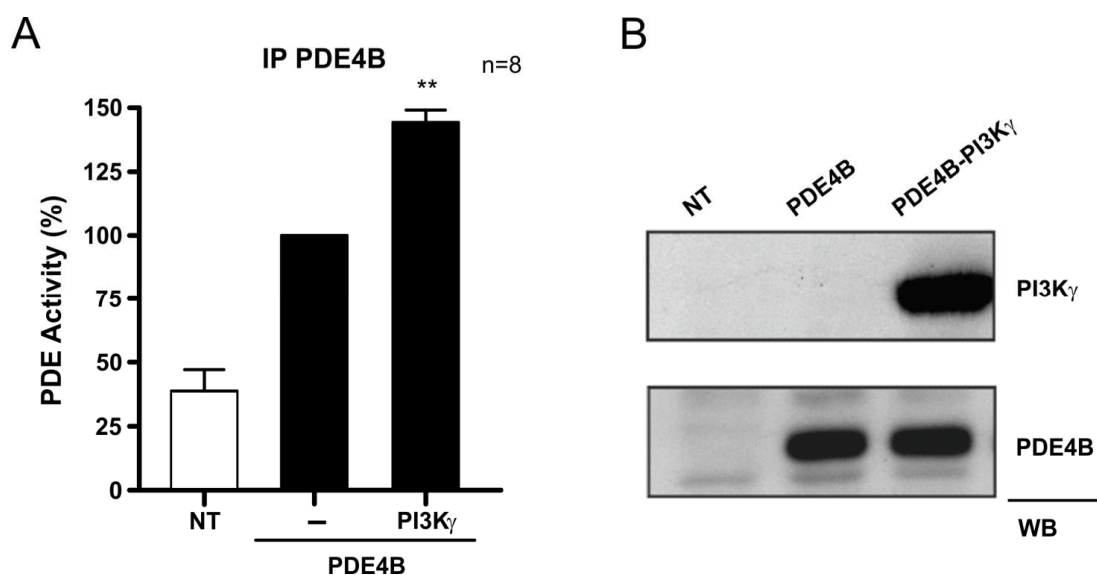


Figura 8: Effetto della co-trasfezione di PI3K γ e PDE4B sull'attività catalitica della fosfodiesterasi in cellule HEK293. (A) Attività fosfodiesterasica immunoprecipitata con un anticorpo anti-PDE4B a partire da estratti proteici di cellule HEK293 non trasfettate (NT), over-esprimenti solo PDE4B, o co-trasfettate con PI3K γ e PDE4B. L'attività fosfodiesterasica espressa in percentuale è stata calcolata in relazione all'attività misurata in cellule over-esprimenti solo PDE4B. Ciascun istogramma rappresenta la media $\pm$ SEM di n=8 esperimenti indipendenti. ** Statisticamente diverso da PDE4B: $P < 0.01$; ANOVA ad una via, test *post hoc* di Bonferroni. (B) Analisi Western blot rappresentativa dei livelli di espressione di PDE4B e PI3K γ in cellule HEK293 trasfettate.

PI3Ky modula i livelli di cAMP in cellule muscolari lisce della trachea umana

Per approfondire il ruolo della funzione *scaffold* di PI3Ky nella contrazione della muscolatura liscia, sono stati effettuati esperimenti di FRET (*fluorescence resonance emission transfer*). Queste analisi hanno permesso di misurare il rilascio di cAMP in seguito a stimolazione dei recettori β_2 -adrenergici in cellule ASMC in cui PI3Ky è stata silenziata. A questo scopo cellule ASMC sono state cotrasfettate con la sonda FRET ICUE3 per la quantificazione del cAMP intracellulare e con il plasmide PIK3CG pGFP-V-RS per il silenziamento della forma umana di PI3Ky. La down-regolazione dell'espressione di PI3Ky è stata verificata mediante immunoprecipitazione (Fig. 9A). Inoltre la presenza della GFP (*green fluorescent protein*) nel plasmide utilizzato per il silenziamento e della CFP (*cyan fluorescent protein*) nella sonda FRET ha permesso di selezionare mediante microscopia a fluorescenza singole cellule in cui entrambi i costrutti erano stati internalizzati correttamente. La sintesi di cAMP a valle dei recettori β_2 -ARs è stata stimolata trattando le cellule con Isoproterenolo (Iso, 100nM, 15 secondi), un agonista dei recettori β -adrenergici, in presenza dell'antagonista selettivo dei recettori β_1 -ARs CGP-20712A (CPG, 100nM). L'attivazione dei recettori β_2 -ARs in seguito a stimolazione con Isoproterenolo determina un rapido aumento del cAMP intracellulare, che determina una riduzione nel segnale di FRET rilevato. In seguito a stimolazione dei β_2 -ARs, la modulazione nel tempo del livello di cAMP riflette l'attività delle PDE (Leroy et al., *Circ Res*, 2008), pertanto questa tecnica permette di monitorare l'attività fosfodiesterasica in tempo reale in singole cellule.

Il decremento nel tempo del segnale di FRET è maggiore nelle cellule in cui PI3Ky è stata silenziata rispetto alle cellule trasfettate con il plasmide *scrambled* (Fig. 9C), dimostrando che l'idrolisi del cAMP è ridotta in condizioni in cui l'espressione di PI3Ky è down-regolata. I risultati di più esperimenti indipendenti sono stati espressi come efficienza apparente di FRET. Tale parametro è proporzionale al grado di formazione del complesso Epac1-cAMP e quindi è inversamente proporzionale alla fluorescenza misurata.

L'efficienza apparente di FRET nelle cellule silenziate per PI3K γ è superiore del 40% rispetto all'efficienza misurata nelle cellule trasfettate con il plasmide *scrambled* (PI3K γ shRNA = $7,35 \pm 0,61$; *scrambled* = $4,37 \pm 0,44$) (Fig. 9D).

Questi risultati indicano che la funzione *scaffold* di PI3K γ svolge, attraverso la modulazione dell'attività delle fosfodiesterasi, un ruolo critico nella terminazione del *signaling* cAMP-dipendente a valle dei recettori β_2 -adrenergici.

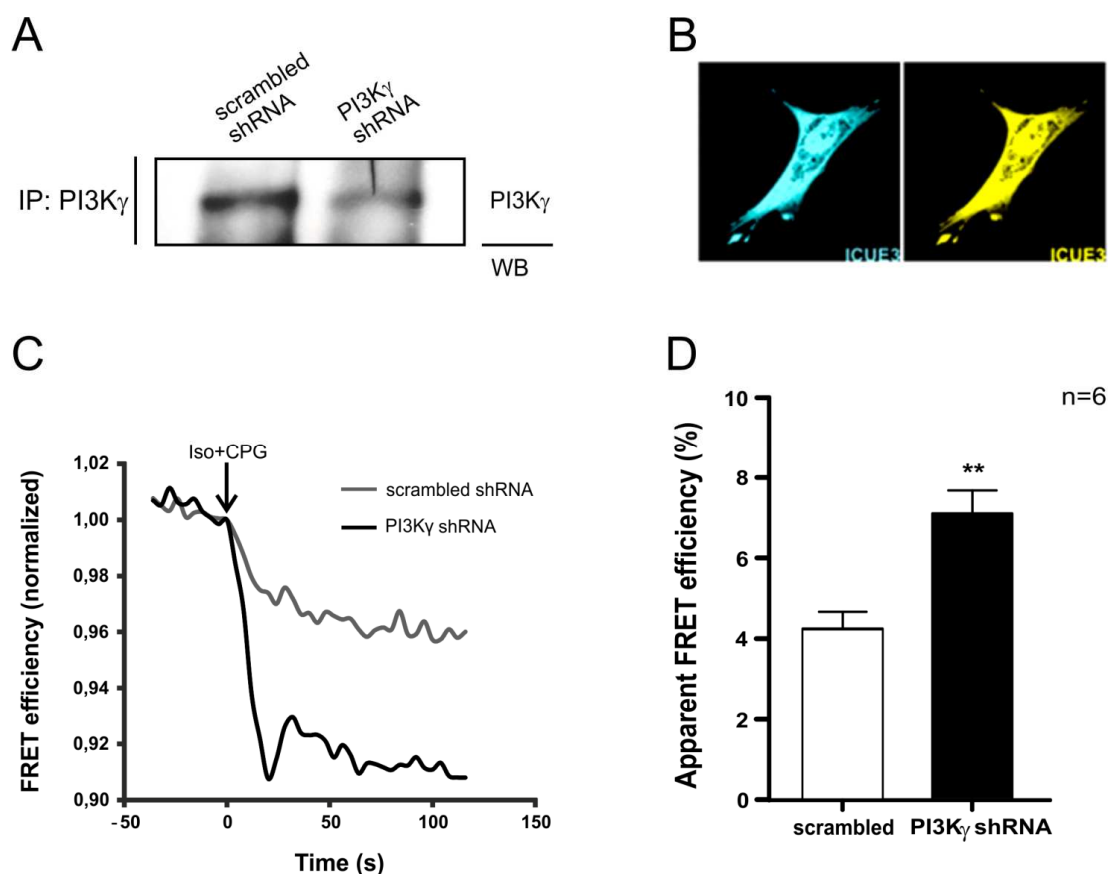


Figura 9: Analisi dei livelli intracellulari di cAMP in seguito a stimolazione β_2 -adrenergica in cellule ASMC esprimenti un shRNA per PI3K γ . (A) Analisi Western blot rappresentativa dei livelli di espressione di PI3K γ negli immunoprecipitati ottenuti da cellule ASMC trasfettate con shRNA PIK3CG pGFP-V-RS e con un shRNA *scrambled*.

(B) Immagine rappresentativa della fluorescenza di CFP e YFP in cellule ASMC trasfettate con la sonda FRET ICUE3 per la quantificazione del cAMP e con shRNA PIK3CG pGFP-V-RS.

(C) Grafico rappresentativo dell'efficienza di FRET ottenuta in cellule ASMC trasfettate con shRNA PIK3CG pGFP-V-RS e con un shRNA *scrambled* e trattate con Isoproterenolo (100nM, 15 secondi) in presenza di CPG-20712A (100nM).

(D) Quantificazione dell'efficienza apparente di FRET (%) in cellule ASMC esprimenti shRNA PIK3CG pGFP-V-RS o un shRNA *scrambled* e trattate con Isoproterenolo e CPG-20712A (100nM, 15 secondi). Ciascun istogramma rappresenta la media $\pm$ SEM di n=6 esperimenti indipendenti.

** Statisticamente diverso da *scrambled*: $P < 0.01$, test t di Student.

PI3K γ si associa con PKA e PDE4B in cellule muscolari lisce della trachea umana

E' stato recentemente dimostrato che nei cardiomiociti PI3K γ promuove la degradazione di cAMP attraverso l'interazione con PDE3B con un meccanismo dipendente dalla presenza di PKA (Perino et al., *Mol Cell*, 2011). Prendendo spunto da questi risultati, la funzione *scaffold* di PI3K γ è stata caratterizzata in cellule ASMC con esperimenti di co-immunoprecipitazione, allo scopo di verificare la presenza di PKA nel complesso macromolecolare.

Come mostrato in Fig. 10, in questo tipo cellulare PI3K γ si associa sia con la subunità regolatoria p101 che con p84/87 e co-purifica con la subunità catalitica di PKA (PKA C; Fig. 10A); al contrario PKA interagisce in modo univoco con la subunità p84/87 di PI3K γ (Fig. 10B). Ulteriori esperimenti di co-immunoprecipitazione hanno permesso di dimostrare che PDE4B interagisce sia con PI3K γ (Fig. 10C) sia con PKA (Fig. 10D).

Questi risultati dimostrano che p110 γ , in associazione con la subunità regolatoria p84/87, forma un complesso proteico con PKA e PDE4B in cellule ASMC.

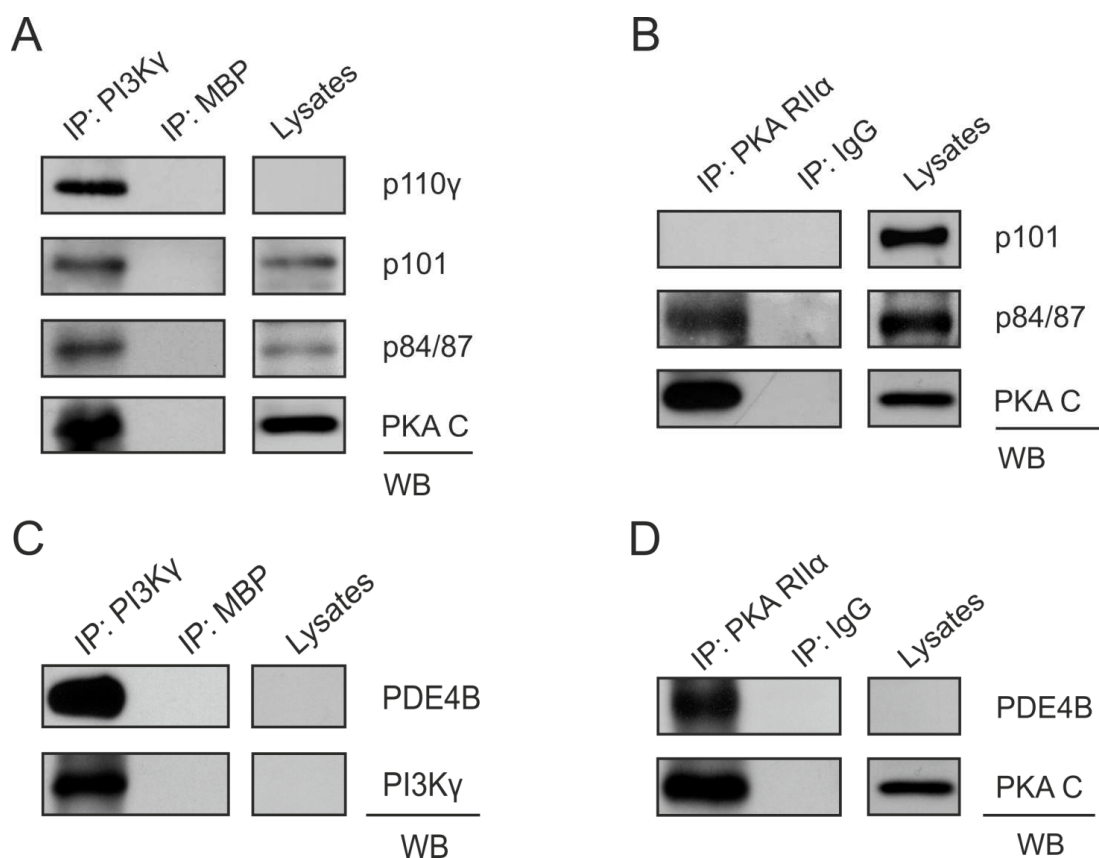


Figura 10: Caratterizzazione del complesso proteico PI3Kγ/PKA/PDE4B in cellule muscolari lisce delle vie respiratorie umane (ASMC). (A) Co-immunoprecipitazione di p110γ, p101, p84/87 e della subunità catalitica α di PKA (PKA C) in cellule ASMC. (B) Co-immunoprecipitazione della subunità regolatoria RIIα di PKA (PKA RIIα) con p84/87, ma non con p101 in cellule ASMC. (C) Co-immunoprecipitazione di PDE4B con PI3Kγ e (D) con la subunità regolatoria RIIα di PKA (PKA RIIα) in cellule ASMC. Ciascun pannello mostra una co-immunoprecipitazione rappresentativa di n=3 esperimenti indipendenti.

Discussione

In questo studio è stata investigata la funzione di PI3K γ nel modulare il *signaling* del cAMP e il conseguente effetto sulla regolazione della contrazione del muscolo liscio delle vie aeree.

Inizialmente è stata verificata l'espressione di PI3K γ in cellule muscolari lisce della trachea murina (TSMC), in cellule muscolari lisce delle vie respiratorie umane (ASMC) e in trachee murine complete. Come osservato anche in cellule muscolari di aorta (Vecchione et al., *J Exp Med*, 2005), i livelli di espressione di PI3K γ nella muscolatura liscia sono molto bassi e la proteina può essere rilevata mediante Western blot solo in seguito ad immunoprecipitazione. L'analisi in Western blot dell'espressione di PI3K γ ha evidenziato la presenza di una banda singola negli immunoprecipitati ottenuti da ASMC e TSMC e di un doppietto negli estratti proteici totali di trachea murina e cellule mononucleate del sangue periferico umano (PBMC). L'esistenza di due isoforme della subunità catalitica p110 γ è stata dimostrata in neutrofili purificati da sangue di maiale (Stephens et al., *Cell*, 1997): in questo tipo cellulare è stato possibile separare una subunità catalitica di 117kDa (PI3K-A) e una di 120kDa (PI3K-B) entrambe associate all'adattatore p101 e attivate dalla subunità $\beta\gamma$ delle proteine G eterotrimeriche. Nonostante questa iniziale scoperta, la presenza di due isoforme di PI3K γ non è stata ulteriormente investigata e attualmente non sono riportate in letteratura indicazioni riguardo al significato funzionale che potrebbe avere. In questo lavoro di tesi è stato dimostrato che cellule muscolari lisce delle vie respiratorie umane e murine esprimono solo la subunità catalitica di 117kDa (PI3K-A), mentre nella trachea murina totale e in cellule immunocompetenti sono presenti entrambe le isoforme. Poiché l'isoforma da 117kDa è priva di circa 20 aminoacidi all'N-terminale (Stephens et al., *Cell*, 1997) e che proprio il terminale amminico è responsabile di importanti interazioni proteina-proteina (Krugmann et al., *J Biol Chem*, 1999; Pacold et al., *Cell*, 2000; Perino et al., *Mol Cell*, 2011), le due isoforme potrebbero interagire con proteine differenti ed essere coinvolte in meccanismi di regolazione distinti.

L'attività di chinasi lipidica e proteica di PI3K γ è stata molto studiata, soprattutto in cellule immunocompetenti, per la sua implicazione in malattie infiammatorie croniche, come l'artrite reumatoide, e nel cancro. Accanto all'attività enzimatica, PI3K γ possiede un'importante attività *scaffold* che è

coinvolta nella regolazione della funzionalità cardiaca e nell'omeostasi del cAMP (Crackower et al., *Cell*, 2002). Infatti, topi *knockout* per PI3Ky mostrano un marcato aumento della contrattilità cardiaca, che è dovuto ad un aumento dei livelli di cAMP nei cardiomiociti sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione β_2 -adrenergica. Tuttavia topi che esprimono una forma di PI3Ky priva dell'attività catalitica (*kinase-dead*) non mostrano alterazioni nella contrattilità cardiaca, suggerendo che l'effetto sull'omeostasi del cAMP è dovuta alla funzione *scaffold* di PI3Ky. Al contrario di quanto accade nei cardiomiociti, nel muscolo liscio dell'apparato respiratorio un aumento del contenuto intracellulare di cAMP causa rilassamento muscolare e tale effetto viene ancora oggi sfruttato nel trattamento della sintomatologia dell'asma, dove gli agonisti dei recettori β_2 -ARs vengono utilizzati per contrastare la broncocostrizione. In accordo con queste premesse, la contrazione di trachee ottenute da topi PI3Ky *knock-out* in seguito a stimolazione colinergica risulta inferiore in termini di efficacia massima rispetto alla contrazione misurata in trachee di animali *wild-type* e *kinase-dead*. Ciò dimostra che PI3Ky è coinvolta nella regolazione della contrazione del muscolo respiratorio prevalentemente attraverso la sua funzione *scaffold*.

Poiché la ridotta contrazione al carbacolo osservata negli animali PI3Ky *knock-out* potrebbe essere dovuta ad una ridotta degradazione del cAMP, è stata valutata l'attività fosfodiesterasica in trachee e in cellule muscolari lisce ottenute da topi PI3Ky *wild-type*, *kinase-dead* e *knock-out*. E' stato precedentemente dimostrato in cellule muscolari lisce dell'aorta di ratto (RASMC) che le fosfodiesterasi più importanti nell'idrolisi del cAMP a valle della stimolazione β -adrenergica sono le PDE4 e in particolare PDE4B è una delle isoforme maggiormente espresse in questo tipo cellulare (Zhai et al., *PLoS One*, 2012). Gli esperimenti di immunoprecipitazione effettuati su trachee di topi *wild-type*, *kinase-dead* e *knock-out* dimostrano che PI3Ky si associa in modo costitutivo con la fosfodiesterasi 4B. Inoltre, i saggi di attività enzimatica condotti su trachee e su cellule muscolari lisce delle vie aeree (TSMC) isolate da topi PI3Ky *wild-type*, *kinase-dead* e *knock-out* dimostrano che l'attività di PDE4B è regolata da PI3Ky ed in particolare che l'interazione tra le due proteine aumenta significativamente l'attività della fosfodiesterasi. Questi dati sono in

accordo con quanto riportato recentemente nel cuore (Ghigo et al., *Circulation*, 2012), dove PI3K γ si associa e regola l'attività di diverse fosfodiesterasi, tra cui PDE4A, PDE4B e PDE3A, e tale regolazione non dipende dalla sua attività enzimatica, ma dalla sua funzione *scaffold*. Tuttavia, in contrasto con quanto riportato nel cuore, gli esperimenti effettuati in questo lavoro di tesi dimostrano che in cellule TSMC PI3K γ non è in grado di regolare l'attività di PDE3A. Questa differenza potrebbe essere dovuta alla peculiare espressione della sola isoforma di p110 γ da 117kDa in cellule muscolari lisce delle vie aeree. Come riportato in precedenza, tale isoforma è priva di circa 20 aminoacidi alla porzione N-terminale e potrebbe pertanto non avere un importante sito d'interazione con PDE3A, che invece è presente nel cuore dove entrambe le isoforme di p110 γ risultano espresse.

In questo lavoro di tesi è stato analizzato il contenuto intracellulare di cAMP in cellule muscolari lisce delle vie aeree umane (ASMC) in seguito a silenziamento di PI3K γ mediante shRNA. Per effettuare questi esperimenti è stata utilizzata una tecnica FRET che sfrutta un biosensore basato sulla sequenza della proteina Epac1 per l'analisi in tempo reale della concentrazione di cAMP in cellule vive (DiPilato and Zhang, *Mol Biosyst*, 2009). Questo approccio è stato già precedentemente applicato a diversi tipi cellulari, in particolare i cardiomiociti primari (Leroy et al., *Circ Res*, 2008; Ghigo et al., *Circulation*, 2012). Il clonaggio della GFP all'interno dei plasmidi shRNA PI3K γ e *scrambled* ha permesso di selezionare per gli esperimenti solamente le cellule in cui l'internalizzazione del costrutto era avvenuta in modo efficiente, garantendo una significativa down-regolazione dell'espressione di PI3K γ . La sintesi di cAMP è stata incrementata stimolando selettivamente i recettori β_2 -ARs; infatti, le cellule sono state incubate per pochi secondi con Isoproterenolo, un agonista dei recettori β -ARs, in presenza di un antagonista dei recettori β_1 -ARs, come CGP-20712A. La breve stimolazione, mediante Isoproterenolo, dei β_2 -ARs ha indotto un significativo aumento nella concentrazione citosolica del cAMP, in accordo con quanto riportato nei cardiomiociti primari (Leroy et al., *Circ Res*, 2008; Ghigo et al., *Circulation*, 2012) e nelle cellule muscolari lisce dell'aorta (Zhai et al., *PLoS One*, 2012) e tale aumento di cAMP è stato misurato come una riduzione nel segnale di FRET. La concentrazione citosolica di cAMP in seguito a stimolazione con

Isoproterenolo è risultata superiore in cellule ASMC in cui PI3Ky era stata down-regolata con uno specifico shRNA. Questo risultato supporta l'ipotesi che PI3Ky agisca come un regolatore negativo del *signaling* a valle dei recettori β -adrenergici. In particolare, in seguito a stimolazione dei recettori β_2 -ARs e in assenza di PI3Ky, la degradazione del cAMP risulta meno efficiente a causa di una ridotta attività di PDE4B. Poichè un maggiore contenuto intracellulare di cAMP determina un maggiore rilassamento muscolare, tale meccanismo potrebbe essere alla base della ridotta contrazione in risposta al carbacolo osservata nelle trachee isolate da topi PI3Ky *knock-out*.

La funzione *scaffold* di PI3Ky è stata caratterizzata in cellule ASMC, con esperimenti di co-immunoprecipitazione. In accordo con quanto riportato in cellule HEK293T trasfettate e in cardiomiociti (Perino et al., *Mol Cell*, 2011), p110 γ forma un complesso molecolare che comprende la subunità regolatoria p84/87, PKA e PDE4B. E' importante sottolineare l'interazione selettiva di PKA con la subunità regolatoria p84/87, ma non con p101. Questa selettività dimostra che le subunità regolatorie di p110 γ non hanno funzioni ridondanti e che vengono reclutate in modo specifico per partecipare a processi cellulari differenti. Questa ipotesi sarebbe in accordo con quanto dimostrato sia in cellule HEK293 trasfettate che nel miocardio murino (Voigt et al., *J Biol Chem*, 2006; Perino et al., *Mol Cell*, 2011), dove è stato riportato che la funzione *scaffold* di PI3Ky è mediata dalla subunità regolatoria p84/87, indispensabile nell'interazione proteina-proteina con PDE3B.

Il ruolo funzionale di questo complesso multiproteico, comprendente p110 γ , p84/87, PKA e PDE4B, può essere quello di mantenere PKA in prossimità di PDE4B per consentire la modulazione localizzata del *signaling* del cAMP, permettendo una regolazione negativa ottimale della segnalazione.

In conclusione, i dati presentati in questo lavoro di tesi dimostrano che nella muscolatura liscia delle vie aeree PI3Ky agisce come un regolatore negativo del *signaling* del cAMP a valle della stimolazione β -adrenergica. In particolare, l'interazione tra PI3Ky, PKA e PDE4B aumenta l'attività della fosfodiesterasi PDE4B, favorendo la degradazione di cAMP necessaria per lo spegnimento della via di segnalazione. Tale meccanismo ha un impatto funzionale rilevante sulla contrazione della muscolatura liscia delle vie aeree. Un'alterata contrattilità

della muscolatura liscia delle vie aeree è alla base di alcune patologie croniche delle vie aeree, in particolare l'asma bronchiale. Dal momento che molte terapie farmacologiche attualmente in uso per il trattamento dell'asma hanno come bersaglio proteine coinvolte nella via di segnalazione β_2 -ARs/cAMP/PKA, la comprensione del ruolo funzionale di PI3K γ in questa cascata di *signaling* risulta particolarmente importante. Ulteriori studi sono quindi necessari per comprendere se e come questi meccanismi di *signaling* associati a PI3K γ vengano alterati in condizioni patologiche e quale sia il loro contributo nell'insorgenza di malattie respiratorie croniche.

Bibliografia

Arner P, Engfeldt P, Hellström L, Lönnqvist F, Wahrenberg H, Sonnenfeld T, Brönnegård M (1990). Beta-adrenoreceptor subtype expression in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* **71**, 1119-1126.

Billington CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S (2012). cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther*, in press.

Bohnacker T, Marone R, Collmann E, Calvez R, Hirsch E, Wymann MP (2009). PI3Kgamma adaptor subunits define coupling to degranulation and cell motility by distinct PtdIns(3,4,5)P3 pools in mast cells. *Sci Signal* **2**, ra27.

Brachmann SM, Yballe CM, Innocenti M, Deane JA, Fruman DA, Thomas SM, Cantley LC (2005). Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement. *Mol Cell Biol* **25**, 2593-2606.

Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Françon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, Rommel C (2005). Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* **11**, 936-943.

Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657.

Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, Scott JD (1991). Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J Biol Chem* **266**, 14188-14192.

Ciraolo E, Iezzi M, Marone R, Marengo S, Curcio C, Costa C, Azzolino O, Gonella C, Rubinetto C, Wu H, Dastrù W, Martin EL, Silengo L, Altruda F, Turco E, Lanzetti L, Musiani P, Rückle T, Rommel C, Backer JM, Forni G, Wymann MP, Hirsch E

(2008). Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci Signal* **1**, ra3.

Condliffe AM, Davidson K, Anderson KE, Ellson CD, Crabbe T, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Turner M, Webb L, Wymann MP, Hirsch E, Ruckle T, Camps M, Rommel C, Jackson SP, Chilvers ER, Stephens LR, Hawkins PT (2005). Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* **106**, 1432-1440.

Conti MA, Adelstein RS (1981). The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **256**, 3178-3181.

Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737-749.

Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, Bernasconi S, Sironi M, Santoro A, Garlanda C, Facchetti F, Wymann MP, Vecchi A, Hirsch E, Mantovani A, Sozzani S (2004). Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J* **23**, 3505-3515.

DiPilato LM, Zhang J (2009). The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst* **5**, 832-837.

Diviani D, Dodge-Kafka KL, Li J, Kapiloff MS (2011). A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1742-1753.

Elis W, Lessmann E, Oelgeschlager M, Huber M (2006). Mutations in the inter-SH2 domain of the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase: effects on catalytic subunit binding and holoenzyme function. *Biol Chem* **387**, 1567-1573.

Ferguson GJ, Milne L, Kulkarni S, Sasaki T, Walker S, Andrews S, Crabbe T, Finan P, Jones G, Jackson S, Camps M, Rommel C, Wymann M, Hirsch E, Hawkins P, Stephens L (2007). PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nat Cell Biol* **9**, 86-91.

Gao Y, Ye LH, Kishi H, Okagaki T, Samizo K, Nakamura A, Kohama K (2001).

Ghigo A, Perino A, Mehel H, Zahradníková A Jr, Morello F, Leroy J, Nikolaev VO, Damilano F, Cimino J, De Luca E, Richter W, Westenbroek R, Catterall WA, Zhang J, Yan C, Conti M, Gomez AM, Vandecasteele G, Hirsch E, Fischmeister R (2012). Phosphoinositide 3-kinase γ protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. *Circulation* **126**, 2073-2083.

Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B (2008). The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8292-8297.

Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **34**, 647-662.

Helgason CD, Damen JE, Rosten P, Grewal R, Sorensen P, Chappel SM, Borowski A, Jirik F, Krystal G, Humphries RK (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev* **12**, 1610-1620.

Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**, 1049-1053

Jarnaess E, Taskén K (2007). Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans* **35**, 931-937.

Jones GE, Prigmore E, Calvez R, Hogan C, Dunn GA, Hirsch E, Wymann MP, Ridley AJ (2003). Requirement for PI 3-kinase gamma in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Exp Cell Res*, **290**, 120-131.

Jurevicius J, Skeberdis VA, Fischmeister R (2003). Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following beta2-adrenergic stimulation of ICa,L in frog ventricular myocytes. *J Physiol* **551**, 239-252.

Krugmann S, Hawkins PT, Pryer N, Braselmann S (1999). Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *J Biol Chem* **274**, 17152-17158.

Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Wymann MP (2002). Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* **16**, 441-451.

Lemmon MA, Ferguson KM (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* **350**, 1-18.

Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechêne P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G (2008). Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca²⁺ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* **102**, 1091-1100.

Leslie NR, Downes CP (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J* **382**, 1-11.

Lim DH, Cho JY, Song DJ, Lee SY, Miller M, Broide DH (2009). PI3K gamma-deficient mice have reduced levels of allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**, L210-219.

Mak JC, Nishikawa M, Haddad EB, Kwon OJ, Hirst SJ, Twort CH, Barnes PJ (1996). Localisation and expression of beta-adrenoceptor subtype mRNAs in human lung. *Eur J Pharmacol* **302**, 215-221.

Manning BD, Cantley LC (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274.

Mulvany MJ, Halpern W (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* **41**, 19-26.

Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB Life* **51**, 337-344.

Omori K, Kotera J (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* **100**, 309-327.

Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF, Williams RL (2000). Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* **103**, 931-943.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP,

Lembo G, Hirsch E (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* **118**, 375-387.

Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, Damilano F, Dunlop AJ, Pawson C, Walser R, Levi R, Altruda F, Silengo L, Langeberg LK, Neubauer G, Heymans S, Lembo G, Wymann MP, Wetzker R, Houslay MD, Iaccarino G, Scott JD, Hirsch E (2011). Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110 γ . *Mol Cell* **42**, 84-95.

Pomel V, Klicic J, Covini D, Church DD, Shaw JP, Roulin K, Burgat-Charvillon F, Valognes D, Camps M, Chabert C, Gillieron C, Françon B, Perrin D, Leroy D, Gretener D, Nichols A, Vitte PA, Carboni S, Rommel C, Schwarz MK, Rückle T (2006). Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Med Chem* **49**, 3857-3871.

Puri KD, Doggett TA, Huang CY, Douangpanya J, Hayflick JS, Turner M, Penninger J, Diacovo TG (2005). The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood* **106**, 150-157.

Reif K, Okkenhaug K, Sasaki T, Penninger JM, Vanhaesebroeck B, Cyster JG (2004). Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* **173**, 2236-2240.

Rommel C, Camps M, Ji H (2007). PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* **7**, 191-201.

Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte

development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **287**, 1040-1046.

Scott JD, Pawson T (2009). Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* **326**, 1220-1224.

Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**, 105-114

Stiles BL (2009). Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10: extending its PTENTacles. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 757-761.

Suire S, Coadwell J, Ferguson GJ, Davidson K, Hawkins P, Stephens L (2005). p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol* **15**, 566-570.

Suire S, Condliffe AM, Ferguson GJ, Ellson CD, Guillou H, Davidson K, Welch H, Coadwell J, Turner M, Chilvers ER, Hawkins PT, Stephens L (2006). Gbetagammas and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* **8**, 1303-1309.

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6199-6204.

Sylvén C, Arner P, Hellström L, Jansson E, Sotonyi P, Somogyi A, Brönnegård M (1991). Left ventricular beta 1 and beta 2 adrenoceptor mRNA expression in normal and volume overloaded human heart. *Cardiovasc Res* **25**, 737-741.

Takeda M, Ito W, Tanabe M, Ueki S, Kato H, Kihara J, Tanigai T, Chiba T, Yamaguchi K, Kayaba H, Imai Y, Okuyama K, Ohno I, Sasaki T, Chihara J (2009). Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 805-812.

Thompson WJ, Appleman MM (1971). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *J Biol Chem* **246**, 3145-3150.

Tridandapani S, Kelley T, Pradhan M, Cooney D, Justement LB, Coggeshall KM (1997). Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol Cell Biol* **17**, 4305-4311.

van Dop WA, Marengo S, te Velde AA, Ciruolo E, Franco I, ten Kate FJ, Boeckxstaens GE, Hardwick JC, Hommes DW, Hirsch E, van den Brink GR (2010). The absence of functional PI3Kgamma prevents leukocyte recruitment and ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Immunol Lett* **131**, 33-39.

Vecchione C, Patrucco E, Marino G, Barberis L, Poulet R, Aretini A, Maffei A, Gentile MT, Storto M, Azzolino O, Brancaccio M, Colussi GL, Bettarini U, Altruda F, Silengo L, Tarone G, Wymann MP, Hirsch E, Lembo G (2005). Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. *J Exp Med* **201**, 1217-1228.

Voigt P, Dorner MB, Schaefer M (2006). Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* **281**, 9977-9986.

Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* **402**, 313-320.

Williams R, Berndt A, Miller S, Hon WC, Zhang X (2009). Form and flexibility in phosphoinositide 3-kinases. *Biochem Soc Trans* **37**, 615-626.

Zaccolo M, Pozzan T (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711-1715.

Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, Leblais V (2012). β -Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One* **7**, e47826.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il dott. Fabrizio Facchinetti, relatore di questa tesi di dottorato, per la grande disponibilità che mi ha sempre dimostrato e per l'aiuto che mi ha fornito nella realizzazione di questo progetto.

Insieme a lui, desidero ringraziare tutto il Dipartimento di Farmacologia di Chiesi Farmaceutici Spa ed in particolare ringrazio Gino Villetti, Anna Rita Pisano e tutti i colleghi del laboratorio di Farmacologia In Vitro per il supporto morale e scientifico che hanno saputo darmi in questi tre anni.

Ringrazio il prof. Emilio Hirsch dell'Università di Torino per avermi ospitata nel suo laboratorio presso il *Molecular Biotechnology Center* e per avermi guidata con la sua esperienza nel mondo delle PI3Ks.

Il ringraziamento più grande va a tutto il gruppo di ricerca del prof. Hirsch ed in particolare ad Alessandra Ghigo ed Alessia Perino per il contributo significativo che hanno dato alla realizzazione degli esperimenti e alla discussione critica dei risultati.