

IL RUOLO DELLA PROTEINA PAXILLINA NELLA SEGNALEZIONE CELLULARE DA PARTE DI FGFR3 CON MUTAZIONE K650M ASSOCIATA A CONDRODISPLASIA

Klarisa Malaj¹, R. Galavotti¹, D. Cerbone², P. M.-J. Lievens¹

¹Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Sezione di Biologia e Genetica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

²SITLab Webinar Supervisor, Medicina di Laboratorio e Trasfusione AOU «Federico II», Napoli

INTRODUZIONE

FGFR3 è un recettore appartenente alla famiglia dei recettori RTK che si trova collocato a livello della membrana cellulare. FGFR3 esprime tre isoforme differenti per grado di glicosilazione: 98 kDa, 120 kDa e 130 kDa. Il legame FGF-FGFR3 in presenza di eparan solfati porta alla dimerizzazione del recettore con successiva attivazione della via di segnalazione cellulare e di numerosi *pathways* cellulari tra cui il *pathway* RAS/RAF/MEK/ERK1/2 che rappresenta la principale via di *signalling* che caratterizza il processo di formazione del tessuto osseo, del quale FGFR3 ne svolge un ruolo fondamentale come regolatore negativo del processo di ossificazione endocondrale. La mutazione K650M in FGFR3 impedisce la formazione della forma matura di 130 kDa e causa una grave forma di condrodisplasia, detta SADDAN.

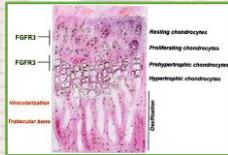


Figura 1. Mottes M. and Lievens P. M.-J. et al. (2016).

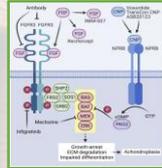


Figura 2. Fafillek B., et al. (2021).

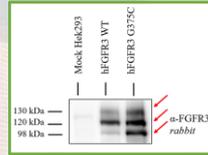


Figura 3. Isoforme del recettore FGFR3.

I condrociti a riposo maturano in condrociti proliferanti, che a loro volta si differenziano in condrociti pre-ipertrofici e successivamente ipertrofici. Questi ultimi vanno incontro ad un processo di apoptosi lasciando lo spazio ai vasi sanguigni e agli osteoblasti trabecolari, consentendo la formazione del tessuto osseo. Alterazioni a carico della molecola di FGFR3, che portano ad un guadagno di funzione rendendo la molecola costitutivamente attiva, provocano una eccessiva attività del recettore a livello del dominio tirosino-chinasi, alterando il processo di accrescimento del tessuto osseo e causando condrodisplasia. Il mutante SADDAN-FGFR3, una volta trasfettato induce un'iperfosforilazione della tirosina 118 a livello della proteina paxillina, causandone un profilo elettroforetico più lento.

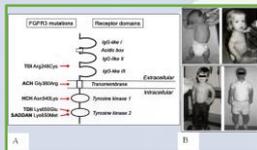


Figura 4 – A. Mottes M. and Lievens P. M.-J. et al. (2016).

Figura 4 – B. Pauli R. M., et al. (2019).

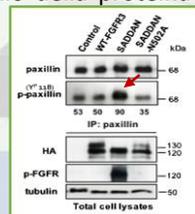


Figura 5 – R. Montone, M. G. Romanelli, A. Baruzzi, F. Ferrarini, E. Liboi, P. M.-J. Lievens. “Mutant FGFR3 associated with SADDAN disease causes cytoskeleton disorganization through PLCγ1/Src-mediated paxillin hyperphosphorylation”, 11 December 2017.

OBIETTIVO

Lo scopo principale è stato quello di approfondire lo studio degli effetti causati dalla mutazione K650M (*Lys650Met*) – SADDAN nel recettore tirosino-chinasi FGFR3 sulla proteina paxillina, analizzando le alterazioni della proteina paxillina iperfosforilata a livello della tirosina 118.

MATERIALI E METODI

È stata effettuata una mutagenesi per inserire la mutazione Y118F (*Tyr118Phe*) nel cDNA umano di paxillina, per poi estrarre il DNA plasmidico del mutante generato pCMV10 3xFlag paxillina Y118F ed analizzarlo tramite elettroforesi su gel d'agarosio, seguita dal sequenziamento del DNA plasmidico mutato per assicurarsi che la mutagenesi fosse avvenuta correttamente. Successivamente, si è proceduto trasfettando il mutante di paxillina generato nella linea cellulare HEK293 per analisi della corretta espressione proteica con il rispettivo controllo di paxillina *wild type*, con la tecnica del Western Blotting. È stata eseguita poi una co-trasfezione cellulare in HEK293 del recettore omologo di topo mFGFR3-WT HA e di mFGFR3-SADDAN HA (contenenti un tag HA) con paxillina *wild type* e mutata Y118F. Infine si è deciso di immunoprecipitare dalla co-trasfezione mFGFR3-WT HA e SADDAN-HA la paxillina *wild type* e mutata Y118F per analisi del livello di fosforilazione di paxillina.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Patricia M.-J. Lievens and Elio Liboi. “The Thanatophoric Dysplasia Type II Mutation Hampers Complete Maturation of Fibroblast Growth Factor Receptor3 (FGFR3), Which Activates Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) from the Endoplasmic Reticulum”, Published: 2003 March 06”.
- [2] Monica Mottes and Patricia Marie-Jeanne Lievens, “Molecular Defects and Cellular Dysfunctions in Restricted Growth Conditions, Chapter4”, 2016.
- [3] R. Montone, M. G. Romanelli, A. Baruzzi, F. Ferrarini, E. Liboi, P. M. – J Lievens. “Mutant FGFR associated with SADDAN disease causes cytoskeleton disorganization through PLCγ/Src-mediated paxillin hyperphosphorylation”, 2018.
- [4] Patricia M.-J. Lievens, Chiara Mutinelli, Darcie Baynes, and Elio Liboi. “The Kinase Activity of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 with Activation Loop Mutations Affects Receptor Trafficking and Signaling”, Published 2004 August 02.
- [5] R. Montone, M. G. Romanelli, A. Barizzo, F. Ferrarini, E. Liboi, P. M.-J. Lievens. “Mutant FGFR3 associated with SADDAN disease causes cytoskeleton disorganization through PLCγ1/Src-mediated paxillin hyperphosphorylation”, 11 December 2017.

IL RUOLO DELLA PROTEINA PAXILLINA NELLA SEGNALEZIONE CELLULARE DA PARTE DI FGFR3 CON MUTAZIONE K650M ASSOCIATA A CONDRODISPLASIA

Klarisa Malaj¹, R. Galavotti¹, D. Cerbone², P. M-J. Lievens¹

¹Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Sezione di Biologia e Genetica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

²SITLab Webinar Supervisor, Medicina di Laboratorio e Trasfusionale AOU «Federico II», Napoli

RISULTATI

1 Mutagenesi di pCMV10 3xFlag paxillina Y118F.

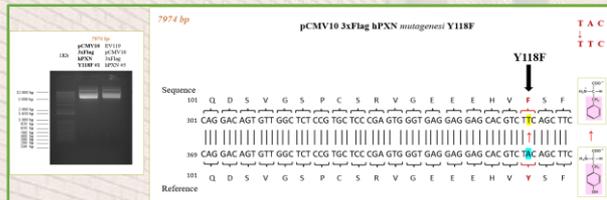


Figura 6. La corsa elettroforetica su gel di agarosio mostra che il DNA plasmidico mutato pCMV10-3xFlag paxillina Y118F risulta del peso molecolare atteso. Il successivo sequenziamento mostra che la reazione di mutagenesi Y118F è avvenuta correttamente.

2 Espressione proteica del mutante pCMV10 3xFlag paxillina Y118.

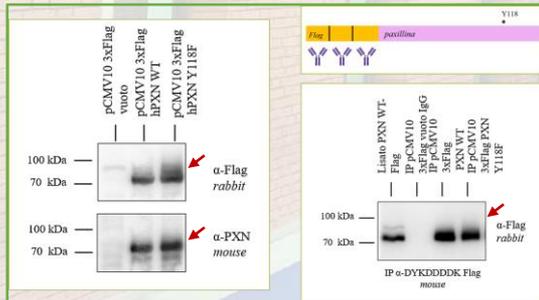


Figura 7. Poiché la mutagenesi è stata effettuata su una molecola che porta il tag Flag all'epitopo 5' nel gene, è stato possibile utilizzare degli anticorpi anti-Flag in Western Blotting per identificare l'espressione della proteina trasfettata

3 Co-trasfezione del recettore mFGFR3-WT HA e SADDAN con paxillina wild type e mutata Y118F.

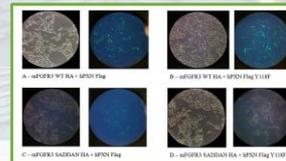


Figura 8. Trasfezione della paxillina mutata Y118F nel recettore mutato SADDAN-mFGFR3 nella linea cellulare HEK293 con i rispettivi controlli. L'immagine mostra il livello di efficienza delle trasfezioni, in quanto è stato trasfettato anche un piccolo quantitativo di GFP.

5 Fosforilazione di paxillina.

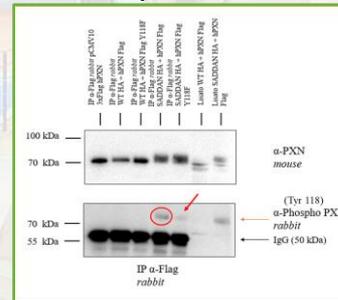


Figura 10. La proteina paxillina immunoprecipitata e incubata con l'anticorpo anti-fosfo paxillina specifico per la Tyr118 evidenzia la fosforilazione della paxillina in SADDAN FGFR3 e l'alterazione del profilo sui campioni isolati insieme alla mutazione SADDAN nel recettore.

4 Co-trasfezione del recettore mFGFR3-WT HA e SADDAN con paxillina wild type e mutata Y118F – Western Blotting.

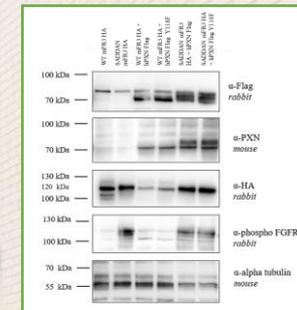


Figura 9. Esperimento chiave dello studio con Western Blotting: risultati della trasfezione della paxillina mutata Y118F nel recettore mutato SADDAN-mFGFR3 nella linea cellulare Hek293 con i rispettivi controlli.

CONCLUSIONI

Benchè sia avvenuta correttamente l'eliminazione della tirosina critica 118 nella proteina paxillina, le isoforme a migrazione più lenta che si osservano in presenza del mutante SADDAN in FGFR3 sono rimaste. Il livello di fosforilazione di paxillina inoltre si è ridotto fortemente, ma non è stato abolito, questo porta all'esclusione di un ruolo unico della tirosina 118 nell'alterazione del profilo elettroforetico della proteina paxillina e all'ipotesi che ci siano altre modifiche post-traduzionali che ne alterino il profilo di migrazione.